

针对骨肿瘤的二级靶向盐酸米托蒽醌纳米粒的制备及体内外性质评价

石勇平, 苏志桂, 肖衍宇, 孙敏捷, 平其能*, 宗莉**

(中国药科大学药剂学教研室, 南京 210009)

摘要 薄膜分散法制备了阿伦磷酸(ALN)配基和叶酸(FOL)配基共同修饰的二级靶向盐酸米托蒽醌(MTO)纳米粒(ALN-FOL-MTO-NLCs)。ALN-FOL-MTO-NLCs经原子力显微镜观察呈较规则类球体, 平均粒径为 (45.9 ± 2.7) nm, Zeta电位为 $-(16.78 \pm 2.17)$ mV, 包封率为 $(99.7 \pm 0.1)\%$ 。体外研究中 ALN-FOL-MTO-NLCs 显示出良好的骨盐吸附能力和K562 细胞主动靶向能力, 1 h 内 72.4% 的纳米粒能吸附于羟基磷灰石, 其 K562 细胞摄取量是普通纳米粒(MTO-NLCs)的 3.19 倍。高效液相色谱法研究了 ALN-FOL-MTO-NLCs 大鼠体内药代动力学及小鼠体内组织分布行为, 其大鼠血浆 AUC 分别为 MTO-NLCs 和药物水溶液(MTO-INJ)的 5.0 和 63.1 倍, 小鼠股骨 AUC 是叶酸单靶向制剂(FOL-MTO-NLCs)和药物水溶液(MTO-INJ)的 3.7 和 5.0 倍, 且与 FOL-MTO-NLCs 相比, 有效降低了药物在肝、脾、心、肾的分布, 进一步降低了药物毒性。因此, 与 MTO-INJ 和 MTO-NLCs 相比, ALN-FOL-MTO-NLCs 具备良好的长循环效果, 靶向骨组织的能力增加, 且具备良好的肿瘤细胞靶向能力。

关键词 骨肿瘤; 二级靶向; 盐酸米托蒽醌; 纳米粒; 制备; 药代动力学; 组织分布

中图分类号 R944 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2013)04-0321-07

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20130407

Preparation and characterization of dual-targeting nanostructure lipid carriers loading mitoxantrone hydrochloride for bone tumor

SHI Yongping, SU Zhigui, XIAO Yanyu, SUN Minjie, PING Qineng*, ZONG Li**

Department of Pharmaceutics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract Dual-targeting nanostructure lipid carriers loading mitoxantrone hydrochloride (ALN-FOL-MTO-NLCs) were prepared by solvent evaporation. ALN-FOL-MTO-NLCs was quasi-spherical shapes observed by AFM and the mean particle size, Zeta potential and entrapment efficiency were (45.9 ± 2.7) nm, $-(16.78 \pm 2.17)$ mV and $(99.7 \pm 0.1)\%$, respectively. In *in vitro* studies, ALN-FOL-MTO-NLCs showed good binding ability to hydroxyapatite, a model component of bone minerals, whereas unmodified NLCs yielded only nonspecific binding. The cellular uptake efficiency of ALN-FOL-NLCs were 3.19 times more than that of unmodified NLCs. The pharmacokinetics in rats and biodistribution in mice of NLCs loading MTO after intravenous injection were investigated by HPLC. The AUC of the blood PK profile of the drug formulated in ALN-FOL-MTO-NLCs were 5.0 and 63.1 times that of unmodified NLCs and free drug (MTO-INJ), respectively. The AUC of the bone PK profile of the drug formulated in ALN-FOL-MTO-NLCs was 3.7-fold and 5.0-fold higher than that of FOL-MTO-NLCs and MTO-INJ, respectively. Compared with FOL-MTO-NLCs, ALN-FOL-MTO-NLCs displayed a reduction in drug toxicity because of the reduced accumulation in liver, spleen, heart and kidney. In turn, this allows administration of larger and more efficacious drug doses. In conclusion, compared with MTO-INJ and MTO-NLCs, ALN-FOL-MTO-NLCs displayed longer circulating capability, better bone targeting ability and tumor cells targeting efficiency.

Key words bone tumor; dual-targeting; mitoxantrone hydrochloride; nanoparticles; preparation; pharmacokinetics; biodistribution

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81273467)

* 收稿日期 2013-01-23 通信作者 * Tel: 025-83271092 E-mail: pingqn2004@yahoo.cn

** Tel: 025-83271317 E-mail: zong216@yahoo.com.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 81273467)

骨肿瘤(bone tumor)可分为原发性和继发性。骨骼会原发性地产生骨肉瘤或白血病等原发性肿瘤,同时,由于骨骼是前列腺癌、肺癌、乳腺癌等恶性肿瘤最常见的转移部位,恶性肿瘤细胞会经血液循环或其他途径散播到血管丰富的骨骼部位生长,产生继发性肿瘤。以白血病为例,采用细胞毒药物联合化疗方案,可使成人急性白血病的完全缓解率达到65%~85%,但是,临床研究发现缓解患者的5年无进展生存率仅为20%~30%,大多数患者死于早期复发,白血病复发的根本原因是常规化疗无法彻底杀死藏匿于骨髓的残留白血病细胞^[1]。对于骨内肿瘤,靶向骨髓腔给药,可使高浓度药物直接作用于骨内肿瘤,大幅提高治疗效果,同时降低对机体正常组织的毒性。临床治疗上已有研究采用骨髓腔直接穿刺注射给药用于骨内肿瘤的治疗,以达到化疗药物短时间、大剂量、高浓度直接作用于肿瘤的目的,进而增强药效、降低药物的全身不良反应,但骨髓穿刺给药明显具有患者顺应性差的缺点,化疗药物对正常造血组织的抑制作用也难以避免。

阿伦磷酸(ALN)是一种二碳磷酸盐,作为骨代谢调节剂,其与骨内膜骨盐,即羟基磷灰石(HA)有很强的亲和力。目前相关骨靶向研究主要集中于二碳磷酸盐对药物分子的共价键修饰,王东等^[2]在PEG链的两端分别共价修饰了阿伦磷酸和药物,较好地实现了药物的骨靶向传递。但相对于骨靶向纳米载体,骨靶向大分子载药量低,易经肾脏排泄,且因共价修饰对反应基团的要求具备分子特异性,同时骨靶向分子还存在药物分子吸附于骨盐后难以释放以及释药过程相关的药效问题。

叶酸受体在正常组织中的表达高度保守,而在大部分恶性肿瘤组织中高度表达,且叶酸与叶酸受体的亲和力比单克隆抗体对肿瘤细胞表面受体亲和力强100倍以上。研究表明,虽然骨髓内正常造血细胞也表达叶酸受体,但因转录后修饰的不同,该受体不能与叶酸高度紧密结合。因此,使用叶酸修饰骨靶向递药系统,可提高递药系统对骨内肿瘤细胞的专属性,在骨组织靶向基础上进一步有效避免对骨内正常造血系统的损害^[3~4]。

本研究以盐酸米托蒽醌(MTO)为模型药物,构建了一种新型的、针对骨内肿瘤的二级靶向纳米系统。该系统分别以阿伦磷酸和叶酸为靶向配基修饰包载盐酸米托蒽醌的脂质纳米粒,相继实现骨组织靶向和肿瘤细胞靶向的二级靶向给药,该设计

思路目前未见文献报道。本研究对该系统的包封率、粒径、电位、形态、HA吸附能力及细胞摄取等性质进行了评价,并研究其在大鼠体内的药代动力学及在小鼠体内的组织分布。

1 材 料

1.1 药品与试剂

盐酸米托蒽醌(四川升和制药有限公司);大豆磷脂(上海东尚实业有限公司);胆固醇、十二烷基硫酸钠、甲醇(国药集团化学试剂有限公司);三月桂酸甘油酯、香豆素-6(日本TCI公司);叶酸-单硬脂酸聚氧乙烯酯共轭物、阿伦磷酸-单硬脂酸聚氧乙烯酯共轭物(PEG链相对分子质量4 400,实验室自制);近红外染料(NIRD,辽宁华海蓝帆化工科技有限公司);羟基磷灰石(HA,上海阿拉丁试剂有限公司);甲醇为色谱纯,其他试剂均为市售分析纯。

1.2 仪 器

RE-52E旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器有限公司);JY92-II超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司);LC-10AT高效液相色谱仪(SPD-10A紫外检测器、HW2000色谱数据工作站,日本岛津公司);酶联免疫测定仪(美国赛默飞世尔公司);原子力显微镜(美国Veeco diNanoScope V公司)。

1.3 细胞株与动物

人白血病K562细胞株购自中国科学院上海分院细胞库。

SD大鼠,雄性,体重(200±10)g。SPF级昆明种小鼠,雄性,体重(20±2)g。实验动物均由南京青龙山动物繁殖中心提供,合格证号SCXK(苏)2007-0008,所有动物实验均符合动物伦理委员会标准。

2 方 法

2.1 盐酸米托蒽醌纳米粒(MTO-NLCs)的制备

精密称取磷脂250mg、三月桂酸甘油酯25mg、胆固醇25mg、盐酸米托蒽醌10mg及十二烷基硫酸钠10mg,置250mL茄形瓶中,并以甲醇-二氯甲烷(1:1)混合溶剂10mL溶解,37℃减压蒸发展成膜并真空过夜,加入2% Cremophor EL水溶液10mL,37℃水浴30min,冰浴探头超声(200W,300次),挤压过0.22μm微孔滤膜,即得。

靶向材料修饰纳米粒制备方法如下:成膜前脂

质材料中另加入叶酸-单硬脂酸聚氧乙烯酯(FOL-S100)20 mg或阿伦磷酸-单硬脂酸聚氧乙烯酯(ALN-S100)100 mg或两者一并加入,其余步骤同上,分别制得叶酸配基修饰、阿伦磷酸配基修饰及双配基修饰纳米粒,依次命名为FOL-MTO-NLCs、ALN-MTO-NLCs和ALN-FOL-MTO-NLCs。

2.2 包封率、粒径、电位及形态

超滤-HPLC法测定纳米粒包封率^[5]。精密移取纳米粒制剂0.1 mL,加蒸馏水0.4 mL稀释,8 000 r/min离心5 min。HPLC法测定滤液及制剂药物含量,计算包封率。取纳米粒制剂0.1 mL,加蒸馏水3.9 mL稀释,测定制剂粒径及Zeta电位。取纳米粒制剂加水稀释,滴至洁净硅晶片上,室温风干,原子力显微镜观察并拍照(接触模式,5 μm扫描器)。

2.3 纳米粒的HA吸附能力

纳米粒制剂加水稀释至主药含量0.1 mg/mL,取50 mL经稀释制剂,加HA 2 g,室温搅拌60 min,定时取样,0.45 μm微孔滤膜过滤,HPLC法测定滤液中未吸附纳米粒及制剂中药物含量,计算纳米粒吸附比例^[6]。

2.4 细胞摄取和细胞毒性

用香豆素-6(C6)取代盐酸米托蒽醌和十二烷基硫酸钠,按“2.1”方法制备荷载C6的纳米粒。取对数生长期K562细胞,以每孔 1×10^5 个细胞的密度接种于24孔板,37 °C孵育24 h,吸去培养液,加入不含血清及叶酸RPMI 1640培养基稀释的系列浓度纳米粒制剂(主药浓度12.5~200 ng/mL),37 °C或4 °C孵育4 h,移去上层供试液,PBS(pH 7.4)洗3遍,每孔加入细胞裂解液150 μL裂解细胞。分别采用BCA蛋白测定试剂盒法及HPLC法测定样品中蛋白及C6的质量浓度^[7]。摄取指数(uptake index, %)=细胞内C6质量浓度/细胞内蛋白质量浓度×100。

以每孔 5×10^3 个细胞的密度将K562细胞接种于96孔板,37 °C培养24 h,使细胞处于对数生长状态。MTO-INJ(药物水溶液)、FOL-MTO-NLCs和ALN-FOL-MTO-NLCs分别用不含叶酸RPMI 1640培养基稀释成系列浓度(0.02~40 μmol/L)。小心吸走每孔培养基后给药,继续培养48 h。小心吸走药物溶液,用37 °C温热HBSS洗涤2~3遍以彻底移走细胞外药物。每孔加MTT溶液(5 mg/mL,PBS溶解)20 μL,继续孵育4 h,每孔加DMSO

150 μL,振荡使结晶物充分溶解^[7]。在酶联免疫监测仪上测定各孔吸收(570 nm),细胞存活率(cell viability, %)=($A_{\text{test}} - A_{\text{blank}}$)/($A_{\text{control}} - A_{\text{blank}}$)×100,其中: A_{test} 表示样本吸收度; A_{control} 表示正常空白细胞吸收度; A_{blank} 表示细胞培养板空白背景值。

2.5 药代动力学研究

取大鼠30只,随机分为5组,每组6只,分别尾静脉注射MTO-INJ、MTO-NLCs、FOL-MTO-NLCs、ALN-MTO-NLCs和ALN-FOL-MTO-NLCs(均相当于含MTO 2 mg/kg)。各组分别于给药后0.08,0.25,0.5,1,2,4,6,8,12,24 h眼底静脉丛取血0.3 mL,肝素抗凝,4 000 r/min离心5 min。精密移取上层血浆100 μL,置离心管中,加入蛋白沉淀剂(含0.5 mol/L HCl甲醇-乙腈,90:10)200 μL,涡旋振荡后冰浴10 min,12 000 r/min离心10 min。定量吸取上清液20 μL,HPLC法测定药物含量。

2.6 组织分布研究

取小鼠54只,随机分为3组,每组18只,分别尾静脉注射MTO-INJ、FOL-MTO-NLCs和ALN-FOL-MTO-NLCs(均相当于含MTO 10 mg/kg)。各组分别于给药后0.5,1,2,6,12,24 h取3只小鼠取血、处死,取心、肝、脾、肺、肾、股骨组织,生理盐水洗净并以滤纸吸干后称重。取血浆及各组织匀浆液,按“2.5”项下操作测定药物含量。

2.7 股骨活体成像研究

用NIRD取代MTO和十二烷基硫酸钠,按“2.1”项下方法制备荷载NIRD的纳米粒。雄性小鼠18只,随机分为3组,分别尾静脉注射普通纳米粒(NIRD-NLCs)、叶酸配基修饰纳米粒(FOL-NIRD-NLCs)和双配基修饰纳米粒(ALN-FOL-NIRD-NLCs),给药剂量0.1 mg/kg。各组给药后分别于0.5,2,4,8,12,24 h处死小鼠1只,分离股骨,用生理盐水清洗后用于活体成像研究(激发波长720 nm,发射波长790 nm)。

3 结果与讨论

3.1 纳米粒包封率、粒径、电位及形态

各纳米粒的包封率、粒径、电位见表1。MTO-NLCs和ALN-FOL-MTO-NLCs的原子力显微镜检查结果见图1。图1中两种粒子圆整,均呈类球形。原子力显微镜样品风干的过程中会发生纳米粒的互相融合和塌陷,故部分纳米粒呈不规则球形。图中ALN-FOL-MTO-NLCs的高度相对于

MTO-NLCs 明显增加(6 nm vs 3 nm),可能是因为前者外层的 PEG 链形成了一层致密的壳状结构,阻止了脂质在风干过程中的过度塌陷。ALN-MTO-NLCs 和 FOL-ALN-MTO-NLCs 表面离子化的 ALN 基团(钠盐形式,荷负电)导致其负电位显著增加。ALN-S100 和 FOL-S100 凭借其 PEG 链的空间位阻作用使纳米粒粒径进一步降低。本研究将纳米粒粒径限定在 50 nm 左右,主要基于以下原因:①研究表明粒径低于 100 nm 的纳米粒能显著减少血浆蛋白的吸附,进而降低肝脾的摄取;②经肾小球毛细血管壁膈膜孔滤除的颗粒粒径一般小于 5 nm^[8];③骨内毛细血管壁孔隙约 80~100 nm。所以本研究盐酸米托蒽醌纳米粒应能有效减少肝脾摄取和肾脏滤过进而顺利进入骨髓腔。此外,叶酸受体呈团簇状分布于细胞表面直径约 60 nm 的“小窝”中,前期研究表明粒径低于 60 nm 的叶酸配体修饰纳米粒更易被细胞内化^[9]。

Table 1 Physicochemical properties of nanostructure lipid carriers (NLCs) ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Preparation	Size/nm	Zeta potential/mV	EE/%
MTO-NLCs	52.3 ± 2.6	-3.38 ± 1.25	99.5 ± 0.3
FOL-MTO-NLCs	50.5 ± 2.0	-3.04 ± 1.57	99.3 ± 0.2
ALN-MTO-NLCs	45.3 ± 2.9	-17.85 ± 2.06	99.6 ± 0.2
ALN-FOL-MTO-NLCs	45.9 ± 2.7	-16.78 ± 2.17	99.7 ± 0.1

MTO: Mitoxantrone; FOL: Folic acid; ALN: Alendronate acid

For the preparation of modified NLCs, ALN-S100 (2 μmol/mL), FOL-S100 (0.4 μmol/mL), or both of them (2 μmol/mL and 0.4 μmol/mL, respectively) were added into the lipid matrix. Based on the modification of agents, the NLCs were named in order as ALN-MTO-NLCs, FOL-MTO-NLCs, and ALN-FOL-MTO-NLCs, respectively

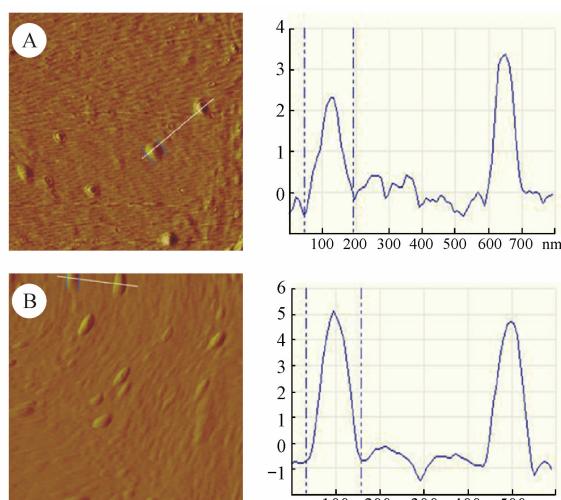


Figure 1 AFM images of MTO-NLCs (A) and ALN-FOL-MTO-NLCs (B)

3.2 纳米粒的 HA 吸附能力

ALN-S100 不同修饰量骨靶向纳米粒的 HA 吸附能力如图 2 所示。普通纳米粒只发生非特异性吸附,ALN-S100 的修饰则能大幅提高纳米粒的吸附能力,且纳米粒的吸附能力随 ALN-S100 修饰量的增加而增加。FOL-S100 的进一步修饰并没有显著降低纳米粒的吸附能力($P > 0.05$),其原因是相对分子质量 4 400 的 PEG 链具备合适的链长和良好的柔韧性,该特点为纳米粒的二级靶向作用奠定了良好的基础^[10]。

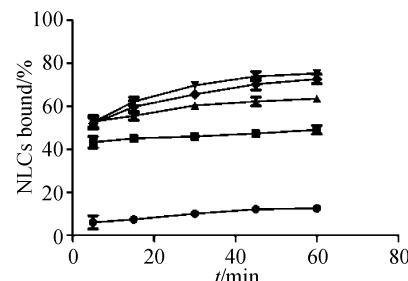


Figure 2 Binding ability of MTO-loaded NLCs to hydroxylapatite (HA) ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.3 纳米粒的细胞摄取和细胞毒性

温度及纳米粒的浓度对细胞摄取的影响如图 3 所示。37 °C 时,细胞对 3 种纳米载体的摄取均显著高于 4 °C,且细胞对 3 种纳米载体的摄取均随着载体浓度的增加而增强,呈现浓度依赖性。在考察的浓度范围内,相同条件下细胞对 3 种纳米粒摄取量由大到小的顺序为:FOL-C6-NLCs、ALN-FOL-C6-NLCs、C6-NLCs。普通的 PEG 化纳米粒在减少免疫系统吞噬、发挥 EPR 效应的同时也会降低靶细胞与载体的亲和力,进而影响靶细胞的摄取,本研究 PEG 化纳米粒经叶酸配基修饰后,在保证 PEG 链空间位阻的同时,显著提高了靶细胞对制剂的摄取^[11]。当纳米粒药物质量浓度达到 100 ng/mL 时,3 种载体的摄取接近饱和,此时 FOL-C6-NLCs 和 ALN-FOL-C6-NLCs 的摄取量分别为 C6-NLCs 的 3.51 和 3.19 倍,ALN-S100 的修饰并没有显著影响($P > 0.05$)叶酸介导的特异性摄取,该特点同样为该制剂的二级靶向作用奠定了良好的基础。MTT 法评价制剂细胞毒性的结果见图 4。由于 K562 细胞对叶酸配基修饰纳米粒的特异性摄取,

叶酸修饰纳米粒和双靶头纳米粒相对于普通纳米粒和药物水溶液,都表现出更强的细胞毒性。

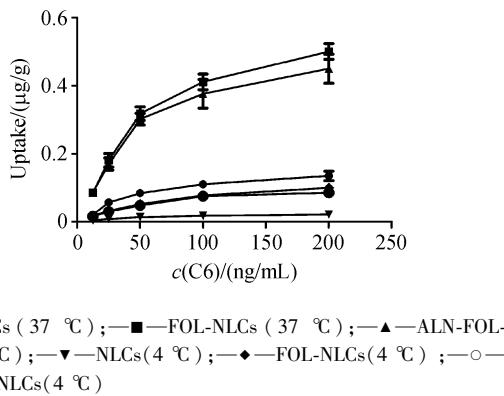


Figure 3 Cell uptake of C6-NLCs, FOL-C6-NLCs and ALN-FOL-C6-

NLCs ($\bar{x} \pm s, n=3$)

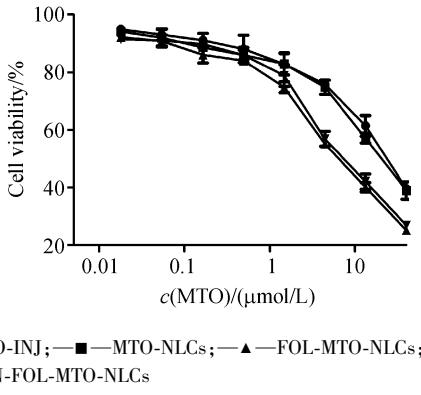


Figure 4 In vitro cytotoxicity test of MTO-INJ and MTO-NLCs with

different concentrations ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.4 药代动力学研究

如图5和表2所示,相对于药物水溶液,将

MTO包覆于纳米粒后显著增加了药物在体内的平均滞留时间(MRT)和血药浓度时间曲线下面积(AUC)($P < 0.05$)。MTO-NLCs、FOL-MTO-NLCs、ALN-MTO-NLCs和ALN-FOL-MTO-NLCs的AUC分别是MTO-INJ的12.5、18.7、46.2和63.1倍。前期研究表明,过量的PEG化修饰会破坏脂质体亲水性和疏水性的平衡,进而破坏脂质体的物理稳定性,加速药物释放。在本研究中,三月桂酸甘油酯、胆固醇和盐酸米托蒽醌与十二烷基硫酸钠形成的离子对能形成一个紧密的内核,在此基础上,相对于普通脂质体,更大比例的两亲性分子如ALN-S100和FOL-S100能更牢固地插入该疏水性内核,为制剂提供牢固而致密的空间位阻,进一步有效地避免免疫系统吞噬,更好地实现肿瘤靶向效果^[12]。

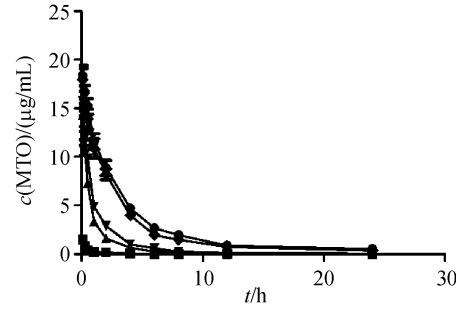


Figure 5 Concentration-time profiles of MTO in rat plasma after iv administration of various preparations ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Main pharmacokinetic parameters of MTO in rats after iv administration of various preparations ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Parameter	MTO-INJ	MTO-NLCs	FOL-MTO-NLCs	ALN-MTO-NLCs	ALN-FOL-MTO-NLCs
AUC/(mg·h/mL)	1.18 ± 0.15	14.71 ± 0.64 *	22.03 ± 1.11 *	54.55 ± 5.19 **	74.46 ± 3.95 **
t _{1/2α} /h	0.11 ± 0.02	0.71 ± 0.07 *	1.09 ± 0.07 *	1.54 ± 0.17 **	1.68 ± 0.16 **
t _{1/2β} /h	1.53 ± 0.20	9.04 ± 1.12 *	13.13 ± 1.15 *	14.41 ± 1.15 *	14.53 ± 1.22 *
CL/(mL/h, ×10 ⁻²)	33.85 ± 1.67	2.72 ± 0.11 *	1.81 ± 0.09 *	0.65 ± 0.05 **	0.54 ± 0.03 **
MRT/h	1.66 ± 0.18	3.83 ± 0.25 *	5.96 ± 0.62 *	9.79 ± 0.51 **	10.77 ± 1.07 **
Vc(L/kg, ×10 ⁻²)	17.22 ± 2.16	3.54 ± 0.51 *	3.47 ± 0.18 *	2.31 ± 0.13 **	2.19 ± 0.10 **

* $P < 0.05$ vs MTO-INJ group; ** $P < 0.05$ vs MTO-INJ, MTO-NLCs and FOL-MTO-NLCs group

3.5 组织分布研究

静脉注射后MTO-INJ、FOL-MTO-NLCs和ALN-FOL-MTO-NLCs在小鼠体内的组织分布情况如图6所示。注射MTO-INJ和FOL-MTO-NLCs 24 h后,骨中药物浓度分别下降到1.87和2.46 μg/g。相比之下,注射ALN-FOL-MTO-NLCs后,骨内药物浓度峰值出现在2 h,存在逐步富集的现象,且由于ALN

基团对骨内膜HA的吸附,纳米粒在骨髓腔内的滞留现象明显,24 h药物浓度仍维持在8.95 μg/g。ALN-FOL-MTO-NLCs骨组织AUC分别为FOL-MTO-NLCs和MTO-INJ的3.7和5.0倍。包含PEG化纳米载体在内的粒径低于50 nm的纳米载体可以轻易地进入骨髓腔,但是也会轻易地排出,即具有良好的渗透性,但滞留效果不佳,本实验表

明经过了 ALN 的修饰,制剂的骨组织滞留效果显著增强。此外,相对于 FOL-MTO-NLCs, ALN-FOL-MTO-NLCs 在肝、脾、心、肾的分布减少,更有效地

降低了制剂对正常组织的毒性,可考虑使用更高剂量以达到更好的疗效^[12]。

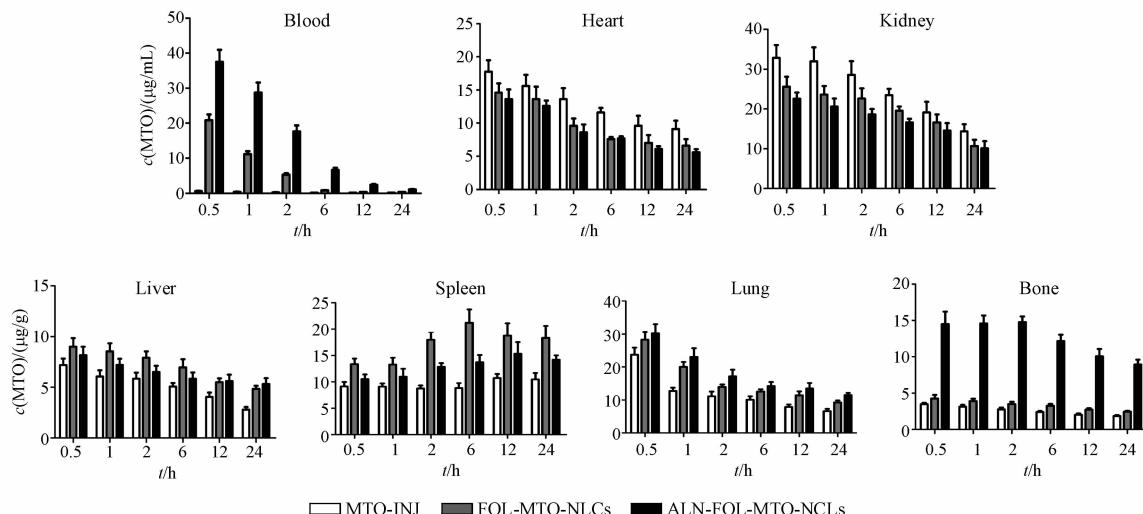


Figure 6 Biodistribution profiles of MTO-INJ, FOL-MTO-NLCs and ALN-FOL-MTO-NLCs after iv administration ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.6 股骨活体成像研究

和骨生理结构相关的一系列因素会影响载体在骨内的分布,如骨血屏障、骨内不同部位的血液供应和骨重建的活跃程度,骨重建(破骨细胞吸收旧骨,成骨细胞形成钙化新骨)的活跃程度又与 HA 在骨表面的形成速度和分布量正相关。股骨的活体成像结果如图 7 所示, NIRD-NLCs、FOL-NIRD-NLCs 和 ALN-FOL-NIRD-NLCs 均主要分布于近端和远端骨髓而并非骨干,其原因主要是近端和远端骨髓血流量丰富,而骨干则主要被脂肪充斥,血流量较小^[13]。近端和远端骨髓骨重建活跃,HA 形成和分布较多,凭借阿伦磷酸基团对 HA 的亲和性,ALN-FOL-NIRD-NLCs 进一步大幅增加了

制剂在此处的分布^[14]。同时, ALN-FOL-NIRD-NLCs 在近端骨髓的分布又明显大于远端骨髓,这主要是因为随着年龄的增长,相对于近端骨髓,远端骨髓的造血功能会相应减少,骨消化和形成速度放缓,阿伦磷酸的吸附部位相对减少^[15]。

4 结论

本研究以阿伦磷酸和叶酸为配体,成功构建了能相继实现骨组织靶向和肿瘤细胞靶向的二级靶向盐酸米托蒽醌纳米粒。制剂主体和配体间采用长且柔韧的 PEG 链连接,保证了两配体能各自发挥作用,互不干扰。本研究为骨内肿瘤的靶向治疗和多级靶向系统的设计提供了一个新颖的思路。

参考文献

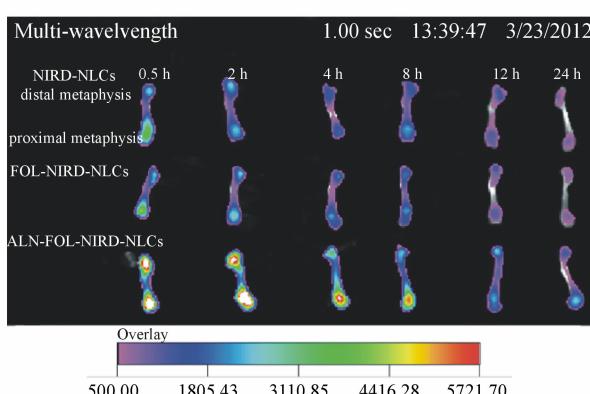


Figure 7 Ex vivo imaging of femurs after iv administration of NIRD-NLCs, FOL-NIRD-NLCs and ALN-FOL-NIRD-NLCs

- [1] Laczika K, Mitterbauer G, Mitterbauer M, et al. Prospective monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia with inversion (16) by CBFbeta/MYH11 RT-PCR: implications for a monitoring schedule and for treatment decisions [J]. *Leuk Lymphoma*, 2001, **42**(5): 923–931.
- [2] Wang D, Miller S, Sima M, et al. Synthesis and evaluation of water-soluble polymeric bone-targeted drug delivery systems [J]. *Bioconjug Chem*, 2003, **14**(5): 853–859.
- [3] Moore NW, Kuhl TL. The role of flexible tethers in multiple ligand-receptor bond formation between curved surfaces [J]. *Biophys J*, 2006, **91**(5): 1 675–1 687.

- [4] Ross JF, Wang H, Behm FG, et al. Folate receptor type beta is a neutrophilic lineage marker and is differentially expressed in myeloid leukemia [J]. *Cancer*, 1999, **85**(2):348–357.
- [5] Zhuang J, Ping Q, Song Y, et al. Effects of chitosan coating on physical properties and pharmacokinetic behavior of mitoxantrone liposomes [J]. *Int J Nanomedicine*, 2010, **5**:407–416.
- [6] Choi SW, Kim JH. Design of surface-modified poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles for targeted drug delivery to bone [J]. *J Control Release*, 2007, **122**(1):24–30.
- [7] Wang H, Zheng X, Behm FG, et al. Differentiation-independent retinoid induction of folate receptor type beta, a potential tumor target in myeloid leukemia [J]. *Blood*, 2000, **96**(10):3 529–3 536.
- [8] Dolman ME, Harmsen S, Storm G, et al. Drug targeting to the kidney: advances in the active targeting of therapeutics to proximal tubular cells [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2010, **62**(14):1 344–1 357.
- [9] Lee RJ, Low PS. Delivery of liposomes into cultured KB cells via folate receptor-mediated endocytosis [J]. *J Biol Chem*, 1994, **269**(5):3 198–3 204.
- [10] Zhang S, Gangal G, Uludag H. ‘Magic bullets’ for bone diseases: progress in rational design of bone-seeking medicinal agents [J]. *Chem Soc Rev*, 2007, **36**(3):507–531.
- [11] Li SD, Huang L. Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles [J]. *Mol Pharm*, 2008, **5**(4):496–504.
- [12] Chang CW, Barber L, Ouyang C, et al. Plasma clearance, biodistribution and therapeutic properties of mitoxantrone encapsulated in conventional and sterically stabilized liposomes after intravenous administration in BDF1 mice [J]. *Br J Cancer*, 1997, **75**(2):169–177.
- [13] Shea JE, Miller SC. Skeletal function and structure: implications for tissue-targeted therapeutics [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2005, **57**(7):945–957.
- [14] Li M, Liang H, Shen Y, et al. Parathyroid hormone stimulates cancellous bone formation at skeletal sites regardless of marrow composition in ovariectomized rats [J]. *Bone*, 1999, **24**(2):95–100.
- [15] Li SD, Huang L. Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles [J]. *Mol Pharm*, 2008, **5**(4):496–504.

• 新药研发 •

2013 年全球新药研发概况(1)

国际著名咨询机构 CiteLine 公司对处于活跃研发状态的在研新药进行了统计分析(包括临床前项目、处于临床研究及注册阶段的项目、增加新适应证的已上市药物)。数据显示,2013 年全球在研药物项目数量为 10 479 个(截至 2013 年 1 月),与 2012 年的 10 452 个(2012 年 5 月)相比基本持平。

整体规模稳定略有增长 2012 年全球在研药物市场规模同比增长了 7.6%,2011~2012 年出现的这种增长势头仍在持续。从 2000 年以来,全球在研药物市场规模一直保持逐步增长的态势。全球在研药物项目数量从 2001 年的 5 995 个增长至 2013 年的 10 479 个,年均增长率达 4.76%。预计未来几年不会出现显著的变化。

2012 年 5 月以来,全球在研药品项目规模总体上并未出现大的变化,尽管在研项目数量整体上并未出现较大的变化,但处于Ⅱ期临床及更后期阶段的在研项目数量均保持增长或维持现状,而这些产品也将是未来几年潜在的上市产品。Ⅰ期临床和临床前阶段的在研项目数量呈下降趋势。

2013 年数据还显示,一些已经上市的新药仍处于在研状态的药品数量呈显著增加的态势,这反映出一种趋势,即越来越多的企业正在试图通过增加产品的新适应证或使用其他生命周期管理方法,来延长其品牌产品的价值。例如,阿达木单抗(修美乐),已在欧盟获批 7 种适应证,也正因为其在多个领域的出色表现,使得该药近年来稳居全球畅销药品排名的前列。

(MedSci, 本刊有删节)