

达沙替尼白蛋白胶束的制备与表征

汪文蝶^{1,2}, 周继源², 唐丽丹^{1*}, 殷婷婕^{2**}(¹南京医科大学附属常州第二人民医院药学部, 常州 213000; ²中国药科大学药学院药剂系, 南京 211198)

摘要 研究制备一种聚乙二醇和十二醛双修饰的牛血清白蛋白(PEG-DSA), 并探讨其作为达沙替尼(dasatinib, DAS)新型高效胶束载体的初步可行性。采用圆二色谱、核磁共振氢谱、元素分析、红外光谱等方法进行材料结构表征, 采用单因素考察法进行PEG-DSA/DAS胶束和非PEG化对照胶束DSA/DAS的工艺优化。结果表明, PEG-DSA与DAS质量比为4:1时可以获得理化性质合适且稳定、载药量高的最优制剂: 平均粒径为(37.21 ± 0.21) nm, 多分散指数PDI为0.24 ± 0.04, Zeta电位为-(15.68 ± 0.19) mV, 载药量(DL)为(10.22 ± 0.34)%, 包封率(EE)为(42.73 ± 1.15)%。与文献报道的DAS纳米制剂相比, PEG-DSA/DAS胶束的载药量显著提高, 具有进一步开发的潜力。

关键词 达沙替尼; 白蛋白两亲性修饰; 白蛋白胶束; 制备; 表征

中图分类号 R944 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2022)03-0286-07

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.20220305

引用本文 汪文蝶, 周继源, 唐丽丹, 等. 达沙替尼白蛋白胶束的制备与表征[J]. 中国药科大学学报, 2022, 53(3): 286 - 292.

Cite this article as: WANG Wendie, ZHOU Jiyuan, TANG Lidian, *et al.* Preparation and characterization of dasatinib albumin micelles [J]. *J China Pharm Univ*, 2022, 53(3): 286 - 292.

Preparation and characterization of dasatinib albumin micelles

WANG Wendie^{1,2}, ZHOU Jiyuan², TANG Lidian^{1*}, YIN Tingjie^{2**}

¹Department of Pharmacy, The Affiliated Changzhou No. 2 People's Hospital of Nanjing Medical University, Changzhou 213000;

²Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

Abstract In this study, a polyethylene glycol and dodecaldehyde modified bovine serum albumin (PEG-DSA) was developed, and its feasibility as a new high-efficiency micellar carrier for dasatinib (DAS) was explored. Circular dichroism, ¹H NMR, elemental analysis, FT-IR and other methods were used to characterize the material structure and the single factor method was used to optimize the process of PEG-DSA/DAS micelles and non-PEGylated control micelles DSA/DAS. The results indicated that the optimal formulation was obtained with a mass ratio of 4 : 1 between PEG-DSA and DAS, with average particle size of (37.21 ± 0.21) nm, polydispersion index (PDI) of (0.24 ± 0.04), Zeta potential of -(15.68 ± 0.19) mV, drug loading (DL) capacity of (10.22 ± 0.34) %, and encapsulation efficiency (EE) of (42.73 ± 1.15) %. Compared with the currently reported nano-formulations of DAS, the drug loading of PEG-DSA/DAS micellar formulations was significantly increased with potential for further development.

Key words dasatinib; albumin amphiphilic modification; albumin micelle; preparation; characterization

This study was supported by the Second Batch of Municipal Science and Technology Projects of Changzhou (No. CJ20199005) and the National Natural Science Foundation of China (No. 81972835)

收稿日期 2021-01-22 *通信作者 *Tel: 0519-81087178 E-mail: tld_kx@163.com

**Tel: 025-83271102 E-mail: cookey_89ytj@163.com

基金项目 常州市第二批市级科技计划立项资助项目(No. CJ20199005); 国家自然科学基金资助项目(No. 81972835)

达沙替尼(dasatinib, DAS)作为第二代酪氨酸激酶抑制剂,是一种非常有效的抑制白血病融合基因 BCR-ABL 的分子靶向药物,对于治疗慢性骨髓性白血病(CML)和费城染色体阳性的急性淋巴细胞白血病(Ph⁺ ALL)治疗效果显著^[1]。近年来, DAS 相关临床实验研究表明, DAS 具有抑制多种实体瘤的增殖、防止肿瘤转移的作用^[2],但其进入机体后不能特异性蓄积于肿瘤组织,因此在抗肿瘤的同时产生严重系统(如胃肠道、造血系统和淋巴系统)不良反应。已有报道 DAS 与非疾病相关的细胞相互作用而引起严重的血液学和非血液学不良反应^[3],导致临床上剂量减少或治疗中断,限制其在实体瘤治疗领域的临床应用。

为了提高 DAS 的实体瘤靶向利用率,研究人员探索开发 DAS 的新型纳米制剂,以期达到增效减毒的目的。但目前 DAS 新制剂的相关报道较少,仅有纳米粒、脂质体、嵌段共聚物、聚合物前药,且前述已报道的新制剂均存在载药量低(均小于 5%)的缺陷,限制了 DAS 高效纳米制剂的研发进程^[4-6]。

白蛋白具有良好的生物相容性、生物可降解性;同时有研究发现, DAS 与白蛋白具有一定的亲和力^[7],提示基于白蛋白的纳米载体有荷载 DAS 的潜力。聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)由重复的氧乙烯基组成,其具有高度的亲水性。PEG 化的纳米制剂,可以降低胶束在体内递送药物过程中与血液蛋白质的结合率,能够有效避免载药胶束被体内单核巨噬细胞系统吞噬而清除^[8],从而提升修饰型白蛋白纳米制剂的血循环时间,提高药物半衰期及其在肿瘤部位的蓄积。

本研究基于已设计合成的烷基化白蛋白^[8],对其进行 PEG 化修饰形成 PEG-DSA,并评价其作为 DAS 新型高效胶束载体的潜力。以圆二色谱、核磁共振氢谱、元素分析法、红外光谱等方法对载体进行了表征;同时采用单因素考察对 PEG-DSA/DAS 胶束的制备工艺筛选优化,制得高载药量的目标制剂,并对其体外稳定性和释放行为进行了研究。

1 材料

1.1 试剂

牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、

十二醛、达沙替尼(上海阿拉丁生物科技有限公司);甲氧基-聚乙二醇 3400-氨基琥珀酰亚胺琥珀酸酯(CH₃O-PEG3400-NHS,上海芃硕生物科技有限公司);硼氢化钠(国药集团化学试剂有限公司);吐温 80(南京威尔化工有限公司);其他试剂均为市售分析纯。

1.2 仪器

PHS-3BW pH 计(南京晚晴仪器有限公司); LGJ-10A-50 冷冻干燥机、Beidi- II YJ 超声波细胞粉碎机(南京贝蒂实验仪器有限公司);Perkin Elmer 2400 II 型有机元素分析仪(美国珀金-埃尔默公司);TU-1810 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);Zetasizer Nano ZS 纳米粒度仪、绝对分子量分析仪(英国马尔文仪器有限公司);Advance 500 型核磁共振波谱、TENSOR 27 型红外光谱仪(瑞士 Bruker 公司)。

1.3 统计学处理

使用 GraphPad Prism 8.0 和 Origin 2019 对数据进行分析处理,统计结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 认为具有统计学意义。

2 方法

2.1 PEG-DSA 载体的合成及表征

2.1.1 合成 十二烷基白蛋白(DSA)载体按已报道的方法^[8]合成。称取 BSA 200 mg,溶于去离子水 10 mL 中,缓慢滴入十二醛 163 μ L,室温搅拌反应 0.5 h 后,滴加 10% 硼氢化钠(NaBH₄)水溶液 140 μ L,继续搅拌 12 h,稀盐酸调节反应溶液 pH 至中性,14 000 r/min 冷冻离心 20 min,0.8 μ m 滤膜过滤,除去不溶于水的十二醛和十二醇,将滤液置于透析袋中,pH 7.4 的磷酸盐缓冲液(PBS)透析 48 h,去离子水透析 24 h,真空冷冻干燥制得白色固体 DSA。随后取 DSA 45 mg 溶于 PBS(pH 7.4) 5 mL 中,向其中加入 CH₃O-PEG3400-NHS 15 mg,避光反应 12 h,去离子水透析 24 h 后冷冻干燥。

2.1.2 圆二色谱测量(CD) 使用长度为 1 cm 的 1 mL 石英比色皿,在 190 nm 至 260 nm 的波长范围内,设置分辨率为 0.2 nm,带宽为 1.0 nm,扫描速度为 100 nm/min,记录 CD 测量值。以 nm 为单位报告光谱,并计算 α -螺旋(α -hexil)的百分比。通常测量蛋白质于 208 nm 与 220 nm 波长处 CD 谱的变化,它的大小一般用平均残基摩尔椭圆率(MRE)

来表示,可以通过公式(1)计算:

$$\text{MRE} = \frac{\text{CD}}{10c_p \cdot n \cdot l} \quad (1)$$

式中, n 是氨基酸残基数目, l 是杯子的路径长度, c_p 是摩尔浓度。

根据公式(2),通过计算 208 nm 处的 MRE 可以得到 α -hexil 的含量:

$$\alpha\text{-hexil}(\%) = \frac{-\text{MRE}_{208} - 4\,000}{33\,000 - 4\,000} \times 100 \quad (2)$$

式中, MRE_{208} 是在 208 nm 处观察到的 MRE,4 000 是 208 nm 处无规卷曲和 β 折叠的 MRE;33 000 是 208 nm 处 α -hexil 的 MRE。

2.1.3 核磁共振氢谱(^1H NMR) 分别称取适量 BSA、DSA、PEG-DSA 溶于 D_2O 中,利用核磁共振仪测定样品的 ^1H NMR 谱图。

2.1.4 红外光谱(FT-IR) 分别称取适量 BSA、DSA、PEG-DSA,于红外灯下与适量 KBr 粉末混合,研磨,压片,并进行红外检测,记录 FT-IR 谱图。

2.1.5 元素分析 采用元素分析法分别测定 BSA 和 DSA 中 C、H、N 3 种元素的摩尔分数,按照公式(3)计算 DSA 中十二烷基的取代度^[8]:

$$\text{十二烷基取代度}(\%) = \frac{(\text{C/N})_{\text{DSA}} - (\text{C/N})_{\text{BSA}}}{10} \times 13.36 \times 100 \quad (3)$$

式中, $(\text{C/N})_{\text{BSA}}$ 与 $(\text{C/N})_{\text{DSA}}$ 分别表示 BSA 与 DSA 中碳原子氮原子的物质的量之比;13.36 是指 BSA 分子中可反应氮原子(61)与总氮原子(815)物质的量之比^[9]。

2.2 DSA/DAS, PEG-DSA/DAS 胶束的制备及处方优化

分别称取载体 18 mg,溶于去离子水 3 mL,另取 DAS,溶于一定体积的有机溶剂中,并缓慢滴加至上述载体水溶液中,以 800 r/min 转速搅拌 10 min,以 200 W 功率探头超声处理 20 min,随后置于透析袋(相对截留分子质量为 7 000),每隔 4 小时更换去离子水 2 L,共透析 12 h,9 000 r/min 离心 10 min 后收集上清液即得载药胶束溶液。为制备最优的 DSA/DAS,PEG-DSA/DAS 载药制剂,采用单因素考察法比较达沙替尼的不同溶媒、载体和药物投料比以及载药浓度对上述两个载体载药量的影响。

2.2.1 溶媒 固定载药溶媒的体积为 100 μL ,

DAS 的投料量为 5 mg,考察溶媒分别为二甲基亚砜(DMSO)和 N,N -二甲基甲酰胺(DMF)时载体对 DAS 的荷载情况。

2.2.2 载体和药物投料比 固定载体的投料量为 18 mg,分别考察 DSA、PEG-DSA 与 DAS 的质量比为 8:1,5:1,4.5:1,4:1,3.6:1,3:1 时载体对 DAS 的荷载情况。

2.2.3 有机溶媒体积 固定 DSA、PEG-DSA 与 DAS 的投料比,考察有机溶媒体积分别为 30,50,75,100 μL 时两载体对 DAS 的荷载情况。

2.3 粒径分布及 Zeta 电位

分别取 DAS 含量为 1 mg/mL 的 DSA/DAS 和 PEG-DSA/DAS,25 $^{\circ}\text{C}$ 下测定两载药胶束的粒径, PDI 及 Zeta 电位。

2.4 载药量和包封率

鉴于 DAS 在水相介质中的溶解度极低,因此载药胶束溶液中游离的 DAS 远远低于载入胶束疏水内核的量,故可忽略不计。取适量制备的载药胶束溶液,加入大量 DMF 稀释至一定浓度,超声 5 min 以破坏胶束结构,3 000 r/min 离心后收集上清液,紫外分光光度计测量其在 323 nm 处的吸收度。计算包封率(EE,%) = 载入胶束的 DAS 量/DAS 投药量 $\times 100$,以及载药量(DL,%) = 载入胶束的 DAS 量/(载入胶束的 DAS 量 + 载体质量) $\times 100$ 。

2.5 体外稳定性评价

将 DAS 含量为 0.5 mg/mL 的 DSA/DAS、PEG-DSA/DAS 200 μL 分别置于去离子水和含有 10% 胎牛血清(FBS)的 PBS(pH 7.4) 10 mL 中,在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下分别于 1,2,4,6,10,12,16 h 取样并考察其粒径变化。

2.6 体外释放动力学

采用 pH 为 7.4 和 5.0 两种不同的 PBS 作为释放介质以模拟机体生理环境和细胞内涵体/溶酶体环境,探究制剂体外释放行为。精密量取 PEG-DSA/DAS 和 DSA/DAS 的 10% FBS 溶液(DAS 浓度均为 0.5 mg/mL) 1 mL 于相对截留分子质量为 7 000 的透析袋中,并置于含 0.3% 吐温 80 的 PBS(pH 7.4 及 pH 5.0) 释放介质 250 mL 中,温度设定为 37 $^{\circ}\text{C}$,转速设定为 100 r/min。在预设时间点 1,2,3,4,6,8,10,12 h 时取出释放介质 1 mL,并补充相同体积的新鲜释放介质。采用紫外分光光度计测量在 323 nm 处的吸收度,从而检测 DAS 的释放百分数。

3 结果与讨论

3.1 PEG-DSA 载体的表征

3.1.1 CD 解析 如图 1 所示, DSA 和 PEG-DSA 的 α -螺旋结构在 222 和 208 nm 处有负科顿(Cotton)效应, 表现出两个负的肩峰谱带, 在靠近 192 nm 有一正的谱带。 β 折叠的 CD 谱在 216 nm 有一负谱带, 而在 195 ~ 200 nm 有一正谱带, 表明两个载体均保留了 α -螺旋和 β -折叠。通过“2.1.2”项中公式计算得出: BSA 的 α -螺旋为 39.8%, DSA 的 α -螺旋为 12.4%, PEG-DSA 的 α -螺旋为 13.5%。DSA 与 PEG-DSA 的 α -螺旋结构的百分比虽然较 BSA 的 α -螺旋结构的百分比低, 但从图中可以看出, 其 α -螺旋结构仍占主导, 保留了 BSA 一定的生理活性。

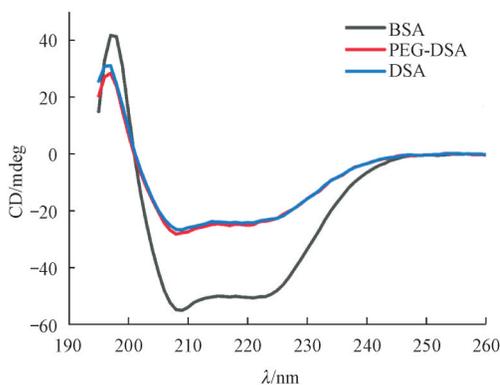


Figure 1 Circular dichroism (CD) diagrams of BSA, DSA and PEG-DSA

BSA: Bovine serum albumin; PEG: Polyethylene glycol; DSA: Dodecyl serum albumin

3.1.2 ^1H NMR 解析 如图 2 所示, DSA 中的 δ 1.24 和 δ 0.84 处的峰分别归属于亚甲基氢和甲基氢^[10]。PEG-DSA 中的 δ 3.65 处为 PEG 的亚甲基峰, 在 δ 1.24 和 δ 0.84 其具有和 DSA 同样的亚甲基氢和甲基氢。表明 MAL-PEG3400-NHS 被成功引入, 由此推断 PEG-DSA 已成功合成。

3.1.3 FT-IR 解析 在 BSA 的红外图谱中(图 3), 可以观察到 $3\ 305\ \text{cm}^{-1}$ 处的 $-\text{OH}$ 伸缩振动峰, $2\ 960\ \text{cm}^{-1}$ 处的甲基 C-H 伸缩振动峰, $2\ 937\ \text{cm}^{-1}$ 处的亚甲基 C-H 伸缩振动峰, $1\ 658\ \text{cm}^{-1}$ 处的酰胺 I 带, $1\ 537\ \text{cm}^{-1}$ 处的酰胺 II 带。DSA 为 BSA 接上十二醛并还原后的结构, 接枝上的基团为 $-\text{CH}_2$, $-\text{CH}_3$, 该结构在 BSA 中已存在, 所以其红外峰与 BSA 基本一致。在 PEG-DSA 的图谱中, $1\ 107\ \text{cm}^{-1}$ 处可见

PEG 中 $-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$ 的对称伸缩振动峰, 表明 $\text{CH}_3\text{O}-\text{PEG}3400\text{-NHS}$ 的成功接入, 结合核磁共振氢谱的数据, 辅助证明 PEG-DSA 的成功合成。

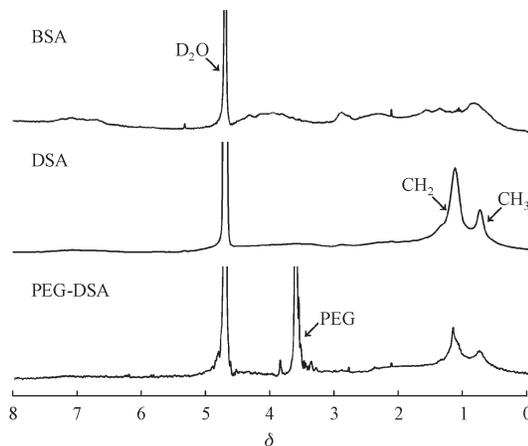


Figure 2 ^1H NMR spectrum of BSA, DSA and PEG-DSA

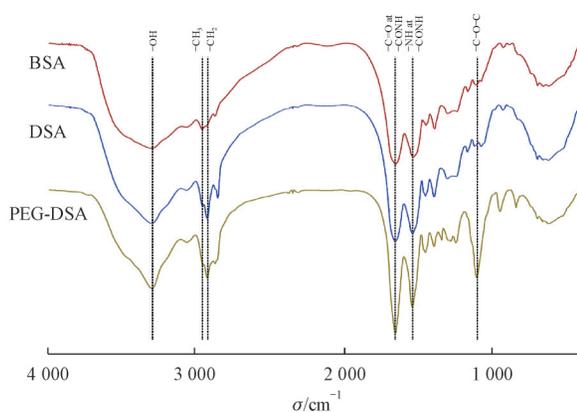


Figure 3 FT-IR spectrum of BSA, DSA and PEG-DSA

3.1.4 元素分析 如表 1 所示, 元素分析实验结果表明, DSA 结构中氨基上的十二烷基取代度为 29.63%。

Table 1 Elemental composition of BSA and DSA

Sample	n(C)/%	n(N)/%	Amino degree of substitution/%
BSA	46.65	13.99	-
DSA	22.96	6.52	29.63

3.2 DSA/DAS, PEG-DSA/DAS 胶束的制备及处方优化

3.2.1 溶媒 如表 2、表 3 所示, 使用 DMSO 或 DMF 所制得的 DSA/DAS 和 PEG-DSA/DAS 的载药量和包封率无显著性差异 ($P > 0.05$)。因此, 两载体皆选择 DMF 为药物的溶媒进行下述的工艺优化。

Table 2 Effect of the organic solvents on loading capacity of DSA micelles for dasatinib(DAS) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Solution	Size/nm	PDI	DL/%	EE/%
DMSO	32.01 ± 0.49	0.29 ± 0.12	12.13 ± 0.72	49.72 ± 2.68
DMF	28.62 ± 1.50	0.28 ± 0.09	14.15 ± 1.44	59.10 ± 0.37

DMSO:Dimethyl sulfoxide; DMF:*N,N*-Dimethylformamide; PDI: Polymer dispersity index; DL: Drug loading; EE: Entrapment efficiency

Table 3 Effect of organic solvents on loading capacity of PEG-DSA micelles for DAS ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Solution	Size/nm	PDI	DL/%	EE/%
DMSO	29.78 ± 0.98	0.30 ± 0.05	4.24 ± 0.59	18.16 ± 1.67
DMF	28.62 ± 1.24	0.28 ± 0.07	4.06 ± 0.36	17.50 ± 1.21

3.2.2 载体和药物投料比 如表4、表5所示,分别对 DSA 和 PEG-DSA 的载药工艺进行筛选,当载体和药物投料比为 8:1 ~ 4:1 时,载药量和包封率随着载体和药物投料比的降低而升高,而当载体和药物投料比降低至 3.6:1 ~ 3:1 时,载药量和包封率却呈下降趋势,这表明此时载体对 DAS 的包

载已达到饱和。综合考虑,确定 DSA 与 DAS 最佳投料比为 3.6:1, DSA 与 PEG-DAS 最佳投料比为 4:1。该处方工艺下,载药量和包封率均最高,且载药量均超过 10%,改善了 DAS 载药量低的难题。

Table 4 Effect of feed mass ratio of DAS to DSA on loading capacity of micelles for DAS ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

DSA/DAS	Size/nm	PDI	DL/%	EE/%
8:1	54.36 ± 3.11	0.34 ± 0.07	4.21 ± 0.53	16.52 ± 2.70
5:1	42.90 ± 1.48	0.27 ± 0.05	8.95 ± 0.24	30.44 ± 1.16
4.5:1	35.76 ± 0.71	0.24 ± 0.04	9.23 ± 0.48	35.12 ± 0.85
4:1	30.89 ± 2.43	0.25 ± 0.03	10.60 ± 1.97	47.68 ± 0.75
3.6:1	29.98 ± 1.07	0.29 ± 0.02	15.03 ± 2.16	63.38 ± 1.34
3:1	32.92 ± 2.12	0.29 ± 0.06	13.33 ± 0.45	58.71 ± 1.06

Table 5 Effect of feed mass ratio of PEG-DAS to DSA on loading capacity of micelles for DAS ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

PEG-DSA/DAS	Size/nm	PDI	DL/%	EE/%
8:1	2.97 ± 1.61	0.28 ± 0.05	1.72 ± 0.13	15.55 ± 1.46
5:1	30.32 ± 2.01	0.23 ± 0.03	7.60 ± 0.31	29.63 ± 0.74
4.5:1	45.76 ± 0.03	0.21 ± 0.02	8.44 ± 0.27	33.16 ± 1.38
4:1	37.21 ± 0.21	0.24 ± 0.04	10.22 ± 0.34	42.73 ± 1.15
3.6:1	48.78 ± 0.98	0.25 ± 0.03	8.82 ± 1.17	34.80 ± 2.39
3:1	61.02 ± 0.57	0.29 ± 0.04	4.93 ± 0.45	20.02 ± 1.26

3.2.3 有机溶剂体积 如表6、表7所示,当有机溶剂体积为 30 μL 时,两载体对 DAS 的荷载能力差,且粒径最大;当有机溶剂体积为 50 μL ,对 DAS 的荷载能力最强,粒径及 PDI 较为理想。故选择使

用有机溶剂 50 μL 进行两载体载药的制备。

综上所述,筛选的最佳载药工艺如下:称取 DSA 或 PEG-DSA 18 mg,加去离子水 3 mL 溶解形成胶束溶液;另取 DAS 5 mg 或 4.5 mg,超声,涡旋

Table 6 Effect of volume of DMF on loading capacity of DSA micelles for DAS ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

V/ μL	Size/nm	PDI	DL/%	EE/%
30	32.19 ± 2.18	0.30 ± 0.07	13.92 ± 1.23	58.35 ± 2.76
50	29.98 ± 1.07	0.29 ± 0.02	15.03 ± 2.16	63.38 ± 1.34
75	26.84 ± 2.10	0.25 ± 0.13	14.39 ± 0.36	60.06 ± 0.90
100	28.62 ± 1.50	0.28 ± 0.09	14.18 ± 1.43	59.15 ± 0.37

Table 7 Effect of volume of DMF on loading capacity of PEG-DSA micelles for DAS ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

V/ μL	Size/nm	PDI	DL/%	EE/%
30	51.32 \pm 0.97	0.28 \pm 0.21	4.92 \pm 0.30	20.05 \pm 1.07
50	37.21 \pm 0.21	0.24 \pm 0.03	10.22 \pm 0.34	42.73 \pm 1.15
75	44.04 \pm 0.78	0.20 \pm 0.10	8.66 \pm 0.53	28.92 \pm 0.94
100	37.06 \pm 1.22	0.23 \pm 0.02	4.02 \pm 0.25	17.56 \pm 0.42

溶解于 DMF 50 μL 中,并缓慢滴加至上述胶束溶液中,剧烈搅拌 10 min,冰浴下探头超声 20 min,去离子水透析 12 h,9 000 r/min 离心 10 min,分别制得 DSA/DAS 或 PEG-DSA/DAS。

3.3 粒径分布及 Zeta 电位

最佳工艺下制备的 DSA/DAS 胶束粒径为 (29.98 \pm 1.07) nm, PDI 为 0.29 \pm 0.02, Zeta 电位为 (-18.27 \pm 0.21) mV。最佳工艺的 PEG-DSA/DAS 胶束粒径为 (37.21 \pm 0.21) nm, PDI 为 0.24 \pm 0.04, Zeta 电位为 (-15.68 \pm 0.19) mV。

3.4 载药量和包封率

按照“2.4”项中的公式计算可得, DSA/DAS 最优处方的制剂载药量为 (15.03 \pm 2.16)%, 包封率为 (63.38 \pm 1.34)%. PEG-DSA/DAS 最优处方的载药量为 (10.22 \pm 0.34)%, 包封率为 (42.73 \pm 1.15)%. 两载体载药量均超过 10% 并远高于文献报道水平。PEG-DSA/DAS 的载药量和包封率低于 DSA/DAS 的原因可能是由于 PEG 的接枝,使得 DSA 载体的水化面积增大,导致 DAS 的负载减少。

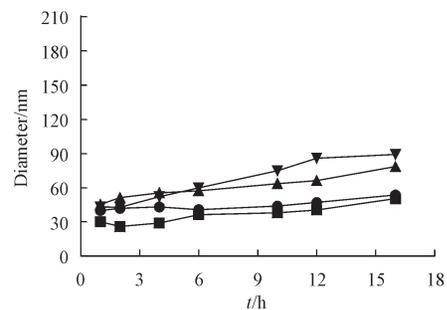
3.5 体外稳定性评价

为了研究胶束的稳定性,考察了纯水环境以及模拟生理条件下,胶束粒径随时间的变化规律。如图 4 所示,胶束在 16 h 内粒径没有显著变化。但在含血清条件下 DSA/DAS 胶束稳定性略低于 PEG-DSA/DAS,可能是由于缺乏 PEG 对生物成分的抗干扰作用,进一步的 PEG 修饰有利于药物经体内运输至肿瘤部位从而发挥药效。

3.6 体外释放动力学

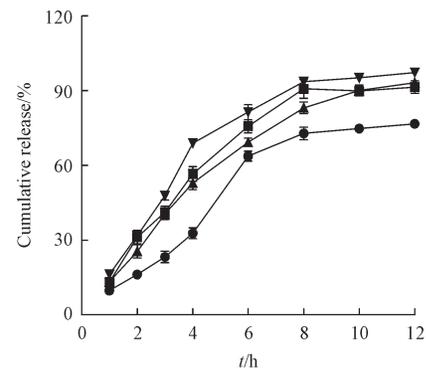
如图 5 所示,在 pH 7.4 生理环境下,PEG-DSA/DAS 中 DAS 在前 4 h 释放较为缓慢,在 8 h 后进入平台期,12 h 累积释药百分率为 75.63%;而在 pH 5.0 细胞内涵体/溶酶体环境下释放加快,8 h 后进入平台期,12 h 累积释药百分率 92.91%,推测可能是由于酸性条件 DAS 释放加快,DAS 的化学结构中存在着 -NH- 氨基官能团,在低 pH 条件下质子化,

从而降低其疏水性,提高亲水性。PEG-DSA/DAS 在 pH 7.4 和 5.0 条件下药物释放速率均低于 DSA/DAS, DSA/DAS 组在 8 h 处几乎完全释放,这表明 PEG 可在生理条件下一定程度提高制剂稳定性,尤其可降低药物在循环过程中的突释。



■ DSA/DAS in water; ● PEG-DSA/DAS in water;
▲ PEG-DSA/DAS 10% FBS; ▼ DSA/DAS in 10% FBS

Figure 4 Time-dependent size changes of DSA/DAS and PEG-DSA/DAS in various medium ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



● PEG-DSA/DAS pH 7.4; ■ PEG-DSA/DAS pH 5.0;
▲ DSA/DAS pH 7.4; ▼ DSA/DAS pH 5.0

Figure 5 *In vitro* release profiles of DAS from PEG-DSA/DAS and DSA/DAS in different medium ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

本研究利用希夫碱反应在 BSA 的氨基上共价修饰十二醛并还原后制得十二烷基白蛋白,并对剩余的氨基进行酰胺化反应接枝 PEG,构建两亲性蛋白偶联物 PEG-DSA。DAS 为疏水性药物,并且和白蛋白有一定的亲和力,能够被包载于 PEG-

DSA胶束的疏水内核中,形成载DAS的纳米胶束。相较于DSA/DAS,PEG-DSA/DAS可通过PEG的水化层进一步抵抗生物干扰,具有延长制剂血循环的潜能。

PEG-DSA作为DAS的递送载体,既实现DAS的有效增溶,又有望提升DAS在肿瘤部位的靶向蓄积;其合成工艺简单,条件温和,能够保留白蛋白的部分生理学活性,具有出色的DAS荷载能力(载药量高达10.22%),且目标载药制剂粒径及分布符合静脉注射要求,稳定性良好。本研究为DAS新型肿瘤靶向制剂的研制提供了依据。

References

- [1] Lindauer M, Hochhaus A. Dasatinib[J]. *Recent Results Cancer Res*, 2018, **212**:29-68.
- [2] Steinberg M. Dasatinib: a tyrosine kinase inhibitor for the treatment of chronic myelogenous leukemia and Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia[J]. *Clin Ther*, 2007, **29**(11):2289-2308.
- [3] Quintás-Cardama A, Kantarjian H, Ravandi F, et al. Bleeding diathesis in patients with chronic myelogenous leukemia receiving dasatinib therapy[J]. *Cancer*, 2009, **115**(11):2482-2490.
- [4] Yao Q, Choi JH, Dai Z, et al. Improving tumor specificity and anticancer activity of dasatinib by dual-targeted polymeric micelles[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, **9**(42):36642-36654.
- [5] Sun JJ, Liu YH, Chen YC, et al. Doxorubicin delivered by a redox-responsive dasatinib-containing polymeric prodrug carrier for combination therapy[J]. *J Control Release*, 2017, **258**:43-55.
- [6] Sabra SA, Sheweita SA, Haroun M, et al. Magnetically guided self-assembled protein micelles for enhanced delivery of dasatinib to human triple-negative breast cancer cells[J]. *J Pharm Sci*, 2019, **108**(5):1713-1725.
- [7] Malarvizhi GL, Chandran P, Retnakumari AP, et al. A rationally designed photo-chemo core-shell nanomedicine for inhibiting the migration of metastatic breast cancer cells followed by photodynamic killing[J]. *Nanomedicine*, 2014, **10**(3):579-587.
- [8] Yin XQ, Huo MR, Zhou JP, et al. Synthesis, characterization and drug loading capacity of dodecyl serum albumin for insoluble antitumor drugs[J]. *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 2011, **42**(4):319-323.
- [9] Suk JS, Xu QG, Kim N, et al. PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, **99**(Pt A):28-51.
- [10] Gong J, Huo MR, Zhou JP, et al. Synthesis, characterization, drug-loading capacity and safety of novel octyl modified serum albumin micelles[J]. *Int J Pharm*, 2009, **376**(1/2):161-168.

·本刊讯·

本刊举办“药学专业论文写作技巧及案例分析”讲座

2022年4月27日,《中国药科大学学报》编辑部邀请中国药科大学药学院药物化学专业博士生导师吴筱星研究员进行题为“药学专业论文写作技巧及案例分析”的专题讲座,本次讲座以腾讯会议线上形式开展,吸引了大批教师和学生积极参与。

本次活动是《中国药科大学学报》编辑部面向作者的学术写作与学术技能系列讲座之一,旨在帮助药学研究生作者专业论文的写作,提高写作水平及投稿质量,同时体现编辑部服务作者的初心。

讲座中,吴筱星研究员结合主讲的科技论文写作课程以及自身丰富的撰稿/投稿经验,就论文的重要版块(结果、讨论、结论)逐一给出详细的案例分析以及每个模块具体的对照检查清单。同时吴老师围绕论文的逻辑性、主体章节逻辑性要求、论文的学术性、论文手稿检查等学生在论文写作中的常见问题给予“手把手”的指导,为大家讲述如何撰写一篇完整优秀的学术论文,让现场的听众们获益匪浅。

除了具体的写作和投稿技巧,吴筱星研究员还特别强调了学术规范与学术伦理对学术环境整体与个人学术生涯的重要影响,告诫作者守住学术诚信的底线,营造风清气正、积极向上的学术生态。

(本刊编辑部)