

## 氨基葡萄糖修饰多柔比星靶向性研究

李斯文, 田俊梅, 金靖, 杜长丽, 赵娟, 顾月清\*

(中国药科大学生命科学与技术学院生物医学工程教研室, 南京 210009)

**摘要** 为了提高多柔比星(Dox)体内靶向性,降低毒副作用,将2-脱氧-氨基葡萄糖(AG)对多柔比星进行靶向配体修饰,形成一种全新抗肿瘤药物。对产物进行<sup>1</sup>H NMR、MS表征,运用近红外成像技术对产物靶向性进行研究,并通过MTT法比较产物与多柔比星对MCF-7细胞和U87MG细胞的药效作用。研究表明,与多柔比星相比,修饰过的产物靶向性和药效作用都有很大提高,具有很好的应用前景。

**关键词** 2-脱氧-氨基葡萄糖;多柔比星;修饰;靶向性

**中图分类号** R914.2 **文献标识码** A **文章编号** 1000-5048(2012)03-0266-05

### Targeted biodistribution of aminoglucose-modified doxorubicin

LI Si-wen, TIAN Jun-mei, JIN Jing, DU Chang-li, ZHAO Juan, GU Yue-qing\*

Department of Biomedical Engineering, School of Life Science & Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

**Abstract** In order to improve *in vivo* targeting of doxorubicin (Dox) and reduce its toxicity, the targeting ligand 2-deoxy-aminoglucose (AG) was used to modify doxorubicin to form a new anti-tumor drug. The products were characterized by <sup>1</sup>H NMR and MS, and the targeting was investigated by near-infrared imaging. Compared with Dox, the product treating MCF-7 and U87MG cells showed higher antitumor activity *in vitro* by MTT assay. In conclusion, the modified products effectively enhanced the targeting and pharmacodynamics in contrast with Dox, and it would be a potential therapeutic drug for cancer.

**Key words** 2-deoxy-aminoglucose; doxorubicin; modify; targeting

多柔比星(doxorubicin, Dox)是临床广泛应用且疗效确切的蒽醌类广谱抗肿瘤药物,长期使用会引起心脏的严重损伤,诱发充血性心力衰竭,且有骨髓抑制作用,对肝、胃、肠等器官的毒性比较明显。近年的临床研究显示,多柔比星对部分肿瘤细胞已产生耐药性。为减少其毒副作用,人们对其结构进行了修饰,以期提高靶向性<sup>[1-3]</sup>。

本研究将具有肿瘤细胞靶向性的氨基葡萄糖(aminoglucose, AG)<sup>[4-5]</sup>与多柔比星通过丁二酸酐(succinic acid, SUC)连接,形成一个具有靶向的、高效的抗肿瘤新药AG-SUC-Dox。为了验证AG的靶向性,本研究将其与一种近红外荧光染料吡啶菁绿(indocyanine green, ICG)-Der-01相连<sup>[6-7]</sup>,在裸鼠体内进行近红外成像<sup>[8-10]</sup>,发现AG靶向性良好。

### 1 材料

#### 1.1 试剂

D-氨基葡萄糖盐酸盐、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCl)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、SUC、4',6-二脒基-2-苯基吡啶(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)(上海阿拉丁试剂公司);三乙胺(美国Sigma-Aldrich公司);二甲基亚砜(DMSO,美国Sigma-Aldrich公司);多柔比星(北京华奉联博科技有限公司);近红外荧光染料ICG-Der-01由本实验室自行合成;其他试剂均为国产分析纯。

#### 1.2 仪器

BS 124S 电子天平(北京赛多利斯仪器公司); Q-TOF Micro 质谱仪(美国Waters公司); AV-500

核磁共振检测仪(美国 Bruker 公司);JH754PC 紫外可见分光光度计(上海菁华科技公司)。

### 1.3 细胞和动物

MCF-7 乳腺癌细胞由中国药科大学奚涛教授提供;U87MG 胶质瘤细胞由中国药科大学郭青龙教授提供。雌性裸鼠 2 只,体重分别为 24 g 和 26 g,鼠龄 4 周[南京市青龙山动物繁殖场,许可证号:SCXK(苏)2007-0001]。

## 2 方法

### 2.1 AG-SUC-Dox 的合成步骤

**2.1.1 2-(3-羧基-1-丙酰氨基)-2-脱氧-D-葡萄糖的合成** 在圆底烧瓶中加入 D-氨基葡萄糖盐酸盐 5.00 g(2.32 mmol),依次加入三乙胺 3.40 mL 和蒸馏水 7.5 mL。10 °C 下搅拌至 D-氨基葡萄糖盐酸盐全部溶解,然后滴加溶解有 SUC 2.50 g 的丙酮溶液反应 4 h。30 °C 减压浓缩得到褐色黏稠液,向其中加入冰醋酸 16 mL。室温静置,析出白色沉淀,抽滤,乙醇和乙醚洗涤,乙醇重结晶。真空干燥,得白色目标化合物 AG-SUC 4.68 g,产率 72%<sup>[11]</sup>。

**2.1.2 AG-SUC-Dox 的合成** 取 AG-SUC 7.00 mg 溶于 DMF 0.5 mL 中,避光 37 °C 水浴搅拌溶解。加入 EDC·HCl 6.98 mg 和 NHS 4.33 mg,避光 37 °C 水浴搅拌 3 h 得溶液 A。取多柔比星盐酸盐 10.00 mg 溶于 DMF 2 mL 中搅拌溶解得溶液 B。将溶液 B 逐滴加入到溶液 A 中,调节 pH 至 7.5,避光搅拌 48 h 得产物 C。将 C 冷冻干燥,用硅胶柱进行分离纯化,即得最终产物 10 mg,产率 49%。合成见路线 1。

### 2.2 体内外靶向研究

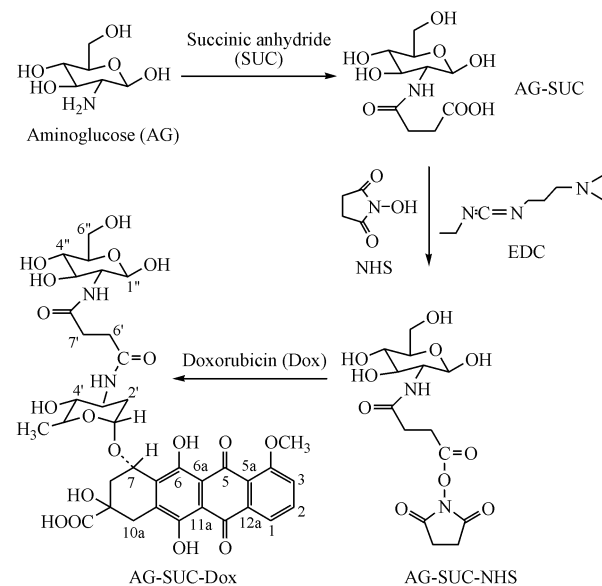
**2.2.1 体外细胞水平靶向研究** 为确定 AG-SUC-Dox 的靶向性,首先在体外选用 MCF-7 细胞观察 Dox 与 AG-SUC-Dox 的细胞靶向作用,将 Dox 与 AG-SUC-Dox 在 MCF-7 细胞中孵育 30 min 后利用共聚焦显微镜观察。

**2.2.2 体内肿瘤水平靶向研究** 将近红外荧光染料 ICG-Der-01 与 AG 进行连接,合成 ICG-Der-01-AG,并对其在正常裸鼠和荷瘤裸鼠体内进行了近红外成像的比较。

ICG-Der-01-AG 在正常裸鼠体内的显像监测

将 ICG-Der-01-AG 10 nmol 静脉注射进入正常裸鼠体内,将裸鼠固定后置于近红外显像系统下进行

检测,分别在注射 0.5,2,4,6,12,24 h 后观察。



**Scheme 1** Synthetic route of aminoglucose-succinate-doxorubicin (AG-SUC-Dox)

NHS: *N*-hydroxysuccinimide; EDC: *N*-ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride

**荷人乳腺癌裸鼠模型的建立** 将裸鼠(nu/nu CD-1,雌性)于 SPF 级动物房适应性饲养 1 周。用  $5 \times 10^{-8}$  mol/L 雌二醇对人乳腺癌 MCF-7 细胞进行诱导培养。取约  $5 \times 10^6$  个细胞于 PBS 缓冲液(pH 7.2)100  $\mu$ L 中制成细胞悬液,分别接种于每只裸鼠右侧前肢腋部皮下( $n = 10$ )。接种后第 2 天,用 1 mg/mL 雌二醇 PBS 缓冲液(pH 7.2),以每只 0.2 mL 于荷瘤裸鼠大腿外侧肌肉注射,每天检测肿瘤生长情况。当肿瘤的直径达到 0.4 ~ 0.6 cm 的时候,动物模型用于显像实验。

**2.2.3 ICG-Der-01-AG 在荷人乳腺癌裸鼠体内的显像监测** 分别将 ICG-Der-01-AG 10 nmol 溶于含 10% DMSO 的 PBS 缓冲液(pH 7.2)和 PBS 缓冲液(pH 7.2)0.2 mL 中。然后分别将这两种探针通过尾静脉注射入两组荷人乳腺癌裸鼠体内( $n = 5$ )。最后将这些裸鼠固定后置于近红外显像系统下进行显像监测。

### 2.3 体外药效分析

采用 MTT 法,选择肿瘤细胞株 U87MG 和 MCF-7 对 AG-SUC-Dox 体外抗肿瘤作用进行筛选,观察 AG-SUC-Dox 对肿瘤细胞的治疗作用。

### 3 结果

#### 3.1 AG-SUC-Dox 的表征

产物 AG-SUC-Dox 经 HPLC 分析纯度达 95%, ESI MS  $m/z$  804[M]<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR 数据见表 1。

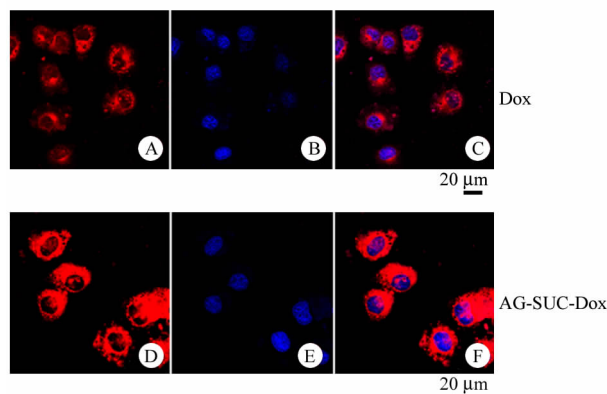
**Table 1** <sup>1</sup>H NMR (500 Hz) data of AG-SUC-Dox

No.	$\delta_{\text{H}}$	No.	$\delta_{\text{H}}$
1	7.42(1H,m)	12	-
2	7.66(1H,m)	12a	-
3	7.38(1H,m)	13	-
4	-	14	5.18(2H,d, $J=2.7\text{Hz}$ )
4a	-	15	3.88(3H,s)
5	-	16	2.67(2H,t, $J=6.6\text{Hz}$ )
5a	-	17	2.62(2H,t, $J=7.4\text{Hz}$ )
6	-	1'	4.25(1H,m)
6a	-	2'	2.04(2H,m)
7	5.47(1H,s)	3'	2.28(1H,m)
8a	2.95(1H,d, $J=17.9\text{Hz}$ )	4',2'',3''	3.90-3.84(3H,m)
8b	2.61(1H,d, $J=18.4\text{Hz}$ )	5'	3.76(1H,m)
9	-	6'	1.34(3H,d, $J=6.5\text{Hz}$ )
10	4.82(2H,s)	1''	5.43(1H,m)
10a	-	4''	3.78-3.73(1H,m)
11	-	5''	3.49-3.44(1H,m)
11a	-	6''	2.66-2.22(2H,m)

#### 3.2 体外细胞水平靶向研究

Dox 在 425 nm 激发光下可产生 560 nm 的发射光,在共聚焦显微镜下可以发出红光(图 1-A、1-D);DAPI 为常用染核试剂,在共聚焦显微镜下可以发出蓝光(图 1-B、1-E)。图 1-C、1-F 为融合后的对照组,其中红光为阿霉素的发射光,蓝光为染核后所发光。A、B、C 为单独加 Dox 组,D、E、F 为加 AG-SUC-Dox 组),AG-SUC-Dox 在细胞表面的荧

光强度明显高于 Dox 单独加药的荧光强度,说明 Dox 在修饰 AG 后可以更快更多的聚集到细胞表面,初步确认 AG-SUC-Dox 的靶向性。

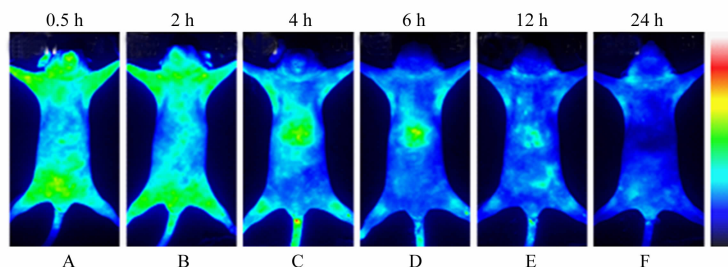


**Figure 1** Targeting detection of Dox (A,B,C) and AG-SUC-Dox (D, E,F) on MCF-7 cells

Dox could emit red light which could observe by confocal microscopy; Group B and E were dyed by DAPI; group C and F were both with DAPI and Dox/AG-SUC-Dox

#### 3.3 体内肿瘤水平靶向研究

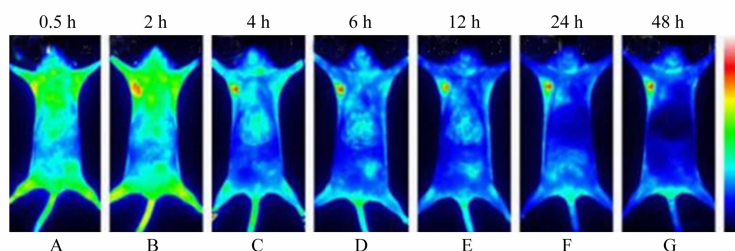
**3.3.1 ICG-Der-01-AG 在正常裸鼠体内的显像监测** ICG-Der-01-AG 在正常裸鼠体内的显像监测如图 2 所示。静脉注射进入裸鼠体内 0.5 h 和 2 h 后,荧光信号在裸鼠全身分布,在 4 h 和 6 h 时荧光信号主要在肝脏部位聚集,并达到最强,随后肝脏信号开始逐渐降低。大约在 12 h 时,仅在肝脏部位还有部分微弱的荧光信号残余,24 h 时,全身荧光信号基本消失。此实验表明 ICG-Der-01-AG 在正常裸鼠体内荧光信号全身分布,无明显靶向作用,同时经肝脏代谢。



**Figure 2** Near infrared imaging of ICG-Der-01-AG in normal nude mice after injection for 24 h. ICG-Der-01-AG has no targeting in normal nude mice and metabolisms by liver

**3.3.2 ICG-Der-01-AG 在荷人乳腺癌裸鼠体内的显像监测** ICG-Der-01-AG 在荷人乳腺癌裸鼠体

内 48 h 内一系列近红外显像图如图 3 所示。

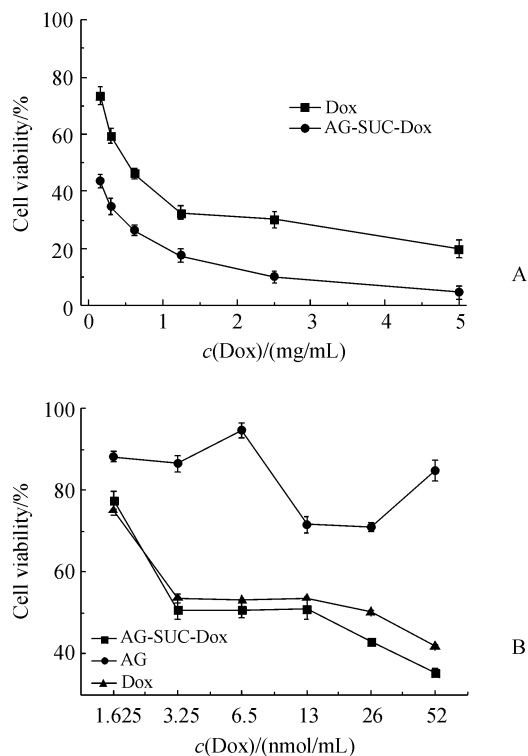


**Figure 3** Near infrared imaging of ICG-Der-01-AG in nude mice bearing MCF-7/estradiol tumors after injection for 48 h. ICG-Der-01-AG has good targeting on the tumor (red point under the nude mouse arm)

监测发现,由脂溶性染料 ICG-Der-01 连接氨基葡萄糖所构建的探针 ICG-Der-01-AG 在 4 h 时能够区分肿瘤轮廓,从周围组织中明显辨别,并且肿瘤部位的荧光信号持续最强(图 3 中小鼠腋下红色光圈处),全身荧光信号直至 24 h 后逐渐消失,而肿瘤部位荧光信号仍然很强,说明 ICG-Der-01-AG 在荷瘤裸鼠体内具有很强的肿瘤靶向能力。

#### 3.4 体外药效分析

MTT 实验结果显示,AG-SUC-Dox 对正常细胞几乎没有毒性,但对肿瘤细胞的抑制明显强于阳性对照药 Dox(图 4,表 2)。



**Figure 4** Anti-tumor effects of Dox and AG-SUC-Dox in U87MG (A) and MCF-7 (B) ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

**Table 2** Toxicity of Dox and AG-SUC-Dox in U87MG and MCF-7

Drug	IC <sub>50</sub> /( $\mu\text{mol/L}$ )	
	MCF-7	U87MG
Dox	14.96	0.55
AG-SUC-Dox	7.57	0.14

## 4 讨论

AG 作为广谱的恶性肿瘤靶向配体,不仅能使其复合物靶向到肿瘤细胞,还能在一定程度上抑制肿瘤细胞的生长,是理想的无免疫源性的小分子广谱肿瘤靶向配体。本研究将其与 Dox 结合优化出结构简单、质量可控、效果明确、且不良反应较小的 AG-SUC-Dox 复合物,成药预计良好,有很好的应用前景。

### 参考文献

- [1] Manente P, Vicario G, Sgarbossa G, et al. Pegylated liposomal doxorubicin for adjuvant treatment of breast cancer in patients refusing therapy with conventional doxorubicin [J]. *J Clin Oncol*, 2010, **28**(15): e11097.
- [2] Hui-Chou HG, Olenczak JB, Drachenberg CB, et al. Short-term application of doxorubicin chemotherapy immunosuppressive side effects for composite tissue allotransplantation [J]. *Ann Plast Surg*, 2012, **68**(2): 215 - 221.
- [3] Monsueza JJ, Charniotb JC, Vignatb N, et al. Cardiac side-effects of cancer chemotherapy [J]. *Int J Cardiol*, 2010, **114**(1): 3 - 15.
- [4] Ganapathy V, Thangaraju M, Prasad PD. Nutrient transporters in cancer; relevance to Warburg hypothesis and beyond [J]. *Pharmacol Ther*, 2009, **121**(1): 29 - 40.
- [5] Nijsten MW, Van-dam GM. Hypothesis: using the Warburg effect against cancer by reducing glucose and providing lactate [J]. *Med Hypotheses*, 2009, **73**(1): 48 - 51.
- [6] Rao JH, Dragulesu-andrasi A, Yao HQ. Fluorescence imaging *in vivo*; recent advances [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2007, **18**(1): 17 - 25.
- [7] Ye Y, Bloch S, Kao J, et al. Multivalent carbocyanine molecular probes; synthesis and applications [J]. *Bioconjug Chem*, 2005, **16**

- (1);51-61.
- [8] Kaijzel EL, van der Pluijm G, Lowik CW. Whole-body optical imaging in animal models to assess cancer development and progression[J]. *Clin Cancer Res*, 2007, **13**(12):3 490-3 497.
- [9] Lewis JS, Achilefu S, Garbow JR, et al. Small animal imaging: current technology and perspectives for oncological imaging[J]. *Eur J Cancer*, 2002, **38**(16):2 173-2 188.
- [10] Nothdurft RE, Patwardhan SV, Akers W, et al. In vivo fluorescence lifetime tomography [J]. *J Biomed Opt*, 2009, **14**(2):024004.
- [11] Qiao Y, Wang AQ, Wang Z, et al. The synthesis of 2-[(3-carboxy-1-oxopropyl) amino]-2-deoxy-D-glucose [J]. *Chem Reagents* (化学试剂), 2004, **26**(2):107-108.

## · 新药信息 ·

### 2012 年有望上市的新药

#### 一、生物制品

1. 诺和诺德公司的糖尿病药物 Degludec 和 Degludec Plus(一种内含超长长效基础胰岛素 Degludec 和速效胰岛素 NovoRapid 的胰岛素配方)
2. 罗氏公司的治疗转移性乳腺癌的 RG1273(帕妥珠单抗)
3. 诺华公司的多组分脑膜炎球菌疫苗 Bexsero
4. 葛兰素史克脑膜炎疫苗 Menhibrix
5. Thrombo Genics 公司的 ocriplasmin(首个非手术治疗玻璃体黏连药物)
6. 赛诺菲的转移性结直肠癌治疗药物 Zaltrap 赛诺菲曾表示 2012 年第一季度将在美国和欧洲提交多发性硬化症药物 Lemtrada 的上市申请;另外,反义产品纯合子家族性高胆固醇血症的治疗药物 Kynamro,将于近期在欧洲上市。
7. NPS 制药公司的短肠综合征治疗药物 Gattex
8. Osiris 公司的干细胞治疗药物 Prochymal 提交了抗宿主病适应证的新药申请。

#### 二、传统产品

1. Amarin 公司以鱼油为基础的降低甘油三酯药物 AMR101
2. Biogen Idec 公司的多发性硬化症药物 BG-12(口服剂型)
3. 辉瑞公司的新型类风湿性关节炎药物 tofacitinib
4. Vertex 公司的囊肿性纤维化药物 Kalydeco 作为囊肿性纤维化治疗的首个调节剂
5. 吉利德公司的四合一抗艾滋病病毒药物 Quad
6. VIVUS 公司的减肥药 Qnexa
7. 肠易激综合征和便秘药物 Linaclotide
8. Medivation 和安斯泰来制药合作开发的前列腺癌药物 MDV3100
9. 百时美施贵宝与阿斯利康合作开发的 dapagliflozin
10. 多发性骨髓瘤药物 Carfilzomib

(医药经济报,本刊有删改)