

# 还原响应性超分子纳米前药的构建及其性能研究

谢 好, 张宜鑫, 严梓铭, 郑良顺, 丁 月\*

南通大学化学化工学院, 江苏 南通

收稿日期: 2024年8月12日; 录用日期: 2024年9月19日; 发布日期: 2024年9月27日

## 摘 要

基于偶联药物的纳米前药体系能够显著提高载药效率和载药量, 还能够避免药物在血液循环过程出现过早泄露的问题, 从而降低药物的毒副作用。因此, 我们设计并制备了还原响应性的偶联药物IR806-CB, 即通过二硫键链接光敏剂IR806和化疗药物苯丁酸氮介CB, 该偶联药物IR806-CB与聚乙二醇-环糊精(PEG-CD)通过苯丁酸氮介与环糊精之间的主客体识别作用、 $\pi$ - $\pi$ 堆积作用和亲疏水作用力在水中自组装形成超分子纳米前药SN-IR806/CB。该超分子纳米前药可以通过高通透性和滞留效应有效地富集在肿瘤组织, 而后再通过内吞作用进入到肿瘤细胞内, 在细胞内的还原环境中, 即在高浓度的谷胱甘肽(GSH)作用下, 二硫键发生断裂, 释放出CB。同时, 在808 nm的近红外光照射下, IR806不仅能够吸收近红外光转换成热能, 使温度升高杀死肿瘤细胞, 而且能够释放出活性氧, 造成癌细胞的死亡。

## 关键词

光动力疗法, 光热疗法, 主客体作用, 超分子纳米前药

# Construction and Property Research of Reduction-Responsive Supramolecular Nanoprodru

Yu Xie, Yixin Zhang, Ziming Yan, Liangshun Zheng, Yue Ding\*

College of Chemistry and Chemical Engineering, Nantong University, Nantong Jiangsu

Received: Aug. 12<sup>th</sup>, 2024; accepted: Sep. 19<sup>th</sup>, 2024; published: Sep. 27<sup>th</sup>, 2024

## Abstract

The nanoprodru system based on drug-drug conjugation can significantly enhance drug loading

\*通讯作者。

文章引用: 谢好, 张宜鑫, 严梓铭, 郑良顺, 丁月. 还原响应性超分子纳米前药的构建及其性能研究[J]. 有机化学研究, 2024, 12(3): 498-504. DOI: 10.12677/jocr.2024.123048

efficiency and drug encapsulation, and prevent premature drug leakage in the bloodstream, which reduce the toxic side effects of drugs. Consequently, we designed and synthesized a reduction-responsive drug conjugate IR806-CB by linking the photosensitizer IR806 with the chemotherapeutic agent N-phenylbutyrate CB through a disulfide bond. The conjugated compound IR806-CB self-assembles with polyethylene glycol-cyclodextrin (PEG-CD) in aqueous solution to form supramolecular nanoprodru g SN-IR806/CB via host-guest recognition between N-phenylbutyrate and cyclodextrin,  $\pi$ - $\pi$  stacking interactions, and hydrophilic-hydrophobic interactions. This supramolecular nanoprodru g can be effectively accumulated in tumor tissues through enhanced permeability and retention effect, subsequently internalized into tumor cells via endocytosis. In the intracellular reducing environment, the disulfide bond could be cleaved under high glutathione (GSH) concentration, leading to the release of CB. Simultaneously, upon irradiation with 808 nm near-infrared light, IR806 not only absorbed near-infrared light for conversion into heat energy that elevated temperature to induce cancer cell death but also generated reactive oxygen species for further cancer cell killing.

## Keywords

Photodynamic Therapy, Photothermal Therapy, Host-Guest Interactions, Supramolecular Nanoprodru g

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



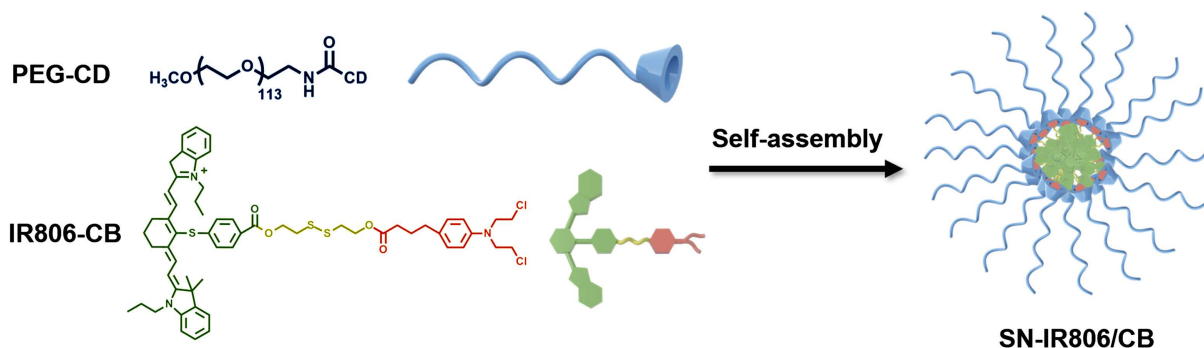
Open Access

## 1. 引言

随着纳米技术的发展, 纳米医学应运而生, 并且成为肿瘤治疗中抗肿瘤药物输送的有效手段之一。它能延长血液循环时间, 通过纳米药物特有的高通透性和滞留效应(EPR)促进药物在肿瘤部位的蓄积效果[1][2]。同时, 基于偶联药物的纳米前药体系表现出极大的潜力, 能够显著提高载药效率和载药量, 还能够避免在药物在血液循环过程出现过早泄露的问题, 从而降低药物的毒副作用[3][4]。这种药物偶联方式通常是用响应性链接基团将两种或几种药物分子连接起来形成前药分子, 再根据相应的刺激条件, 该链接基团会发生响应性断裂并释放活性药物, 起到治疗效果[5][6]。

此外, 光疗通常包括光动力疗法(PDT)和光热疗法(PTT), 通过近红外(NIR)的照射激活光敏剂, 引发活性氧(ROS)的产生或温度的升高, 从而导致癌细胞死亡[7][8]。其中, 光动力疗法被视为一种有潜力的、微创性的治疗癌症和炎症性疾病的方法[9][10]。光动力疗法需要三个要素: 光敏剂、光源和分子氧。通过特定的光辐射, 光敏剂产生活性氧, 从而对肿瘤细胞和组织造成损伤, 包括氧化细胞/亚细胞的膜、蛋白质、RNA 或 DNA [11]。光热疗法则是一种非侵入性治疗方法, 利用近红外光辐射使光热剂产生高温来杀灭癌细胞[12][13]。

本文中, 我们设计并制备了还原响应性的偶联药物 IR806-CB, 即通过二硫键链接光敏剂 IR806 和化疗药物苯丁酸氮介 CB, 该偶联药物 IR806-CB 与聚乙二醇-环糊精(PEG-CD)通过苯丁酸氮介与环糊精之间的主体识别作用和亲疏水作用力在水中自组装形成超分子纳米前药 SN-IR806/CB (图 1)。该超分子纳米前药可以通过高通透性和滞留效应有效地富集在肿瘤组织, 而后再通过内吞作用进入到肿瘤细胞内, 在细胞内的还原环境中, 即在高浓度的谷胱甘肽(GSH)作用下, 二硫键发生断裂, 释放出 CB。同时, 在 808 nm 的近红外光照射下, IR806 不仅能够吸收近红外光转换成热能, 使温度升高杀死肿瘤细胞, 而且能够释放出活性氧, 造成癌细胞的死亡。



**Figure 1.** The schematic illustration of the fabrication of supramolecular nanoprodrug SN-IR806/CB

**图 1.** SN-IR806/CB 超分子纳米前药的制备示意图

## 2. 实验部分

### 2.1. 试验原料与仪器

1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、4-二甲氨基吡啶、苯丁酸氮芥和 2-羟乙基二硫化物购自上海阿拉丁试剂有限公司。聚乙二醇-环糊精(PEG-CD)购自西安齐岳生物科技有限公司。N,N-二甲基甲酰胺(DMF)和二氯甲烷和无水乙醚购自国药集团。参考已有文献得到 IR806 [8]。核磁共振波谱仪的型号为 AgilentAV-400 购于美国 Agilent 公司。Zetasizer Nano ZS90 纳米粒度电位仪购于英国马尔文仪器公司。透射电子显微镜的型号为 JEM-210 购于日本电子株式会社。

### 2.2. 超分子纳米前药的制备及表征

#### 2.2.1. IR806-S-S-OH 的合成

将 36 mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、30 mg 4-二甲氨基吡啶和 200 mg IR806 加入到 20 mL 二氯甲烷反应 4 h, 得到反应液。然后将 110 mg 的 2-羟乙基二硫化物溶于 2 mL 的二氯甲烷中, 并加入到上述反应液中, 室温反应 48 h。反应结束后, 加入 10 mL 去离子水, 分离出有机层并旋干, 再用柱层析法进行提纯得到产物 IR806-S-S-OH 194.8 mg, 产率 82.8%。

#### 2.2.2. IR806-CB 的合成

将 78 mg 的苯丁酸氮芥、40 mg 的 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和 30 mg 的 4-二甲氨基吡啶加入 20 mL 二氯甲烷溶剂搅拌 4 h, 得到反应液。然后将 140 mg 的 IR806-S-S-OH 溶于 2 mL 的二氯甲烷中, 并加入到上述反应液中, 室温反应 48 h。反应结束后, 加入 10 mL 去离子水, 分离出有机层并旋干, 再用柱层析法进行提纯得到产物 IR806-CB 106.8 mg, 产率 76.3%。

#### 2.2.3. 超分子纳米前药 SN-IR806/CB 的制备

将 PEG-CD (10 mg)和 IR806-CB (5 mg)加入 1 mL DMF 中, 搅拌过夜后缓慢滴加 10 mL 去离子水溶液, 继续搅拌 24 h。搅拌结束后, 将溶液置于分子量 2000 的透析袋中, 用 500 mL 去离子水透析 48 h, 每 6 h 换一次去离子水, 透析结束后, 冷冻干燥得到超分子纳米前药 SN-IR806/CB。

### 2.3. 超分子纳米前药 SN-IR806/CB 的性能研究

#### 2.3.1. 超分子纳米前药 SN-IR806/CB 的药物释放

将 5 mL 1 mg/mL 的载药纳米粒子溶液置于透析袋(分子量 2000)中然后分别用 20 mL 含有 GSH (10 mM)的 PBS 和不含有 GSH 的 PBS 溶液中于 37°C 进行透析, 其中光照组, 用 808 nm 1.0 W/cm<sup>2</sup> 近红外光

进行照射 5 min, 在预设的时间点更换相同体积的 PBS 溶液于透析袋中, 通过紫外-可见光谱测定更换的溶液中 CB 的含量。

### 2.3.2. 超分子纳米前药 SN-IR806/CB 的细胞毒性

将 HepG2 细胞按照  $1.0 \times 10^4$  的密度种入 96 孔板中培养 12 h。除去培养基, 分别加入含有不同浓度的 SN-IR806/CB 的培养基, 其中光照组用 808 nm  $1.0 \text{ W/cm}^2$  近红外光进行照射 5 min, 培养 48 h 后除去培养基, 采用 MTT 方法进行细胞活性测试。

## 3. 结果与讨论

### 3.1. 设计原理

#### 超分子纳米前药 SN-IR806/CB 的制备与表征

本文设计合成了还原响应性的偶联药物分子 IR806-CB。具体的合成过程如图 2 所示: 通过参考文献制备得到羧基功能化的 IR806, 再通过酯化反应将其跟二硫键相链接, 得到中间产物 IR806-S-S-OH, 其  $^1\text{H NMR}$  谱图如图 3 所示。接着, 再由酯化反应将化疗药物苯丁酸氮介接在 IR806-S-S-OH 上, 得到目标产物 IR806-CB, 其化学结构由  $^1\text{H NMR}$  谱图证实(图 4)。

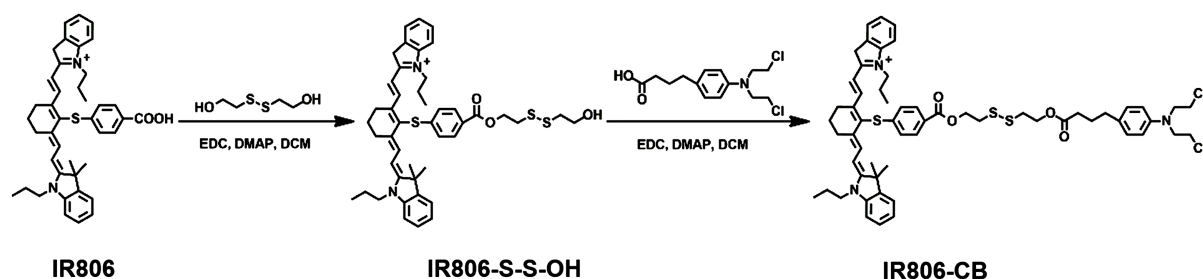


Figure 2. Synthesis of IR806-CB  
图 2. IR806-CB 的合成步骤

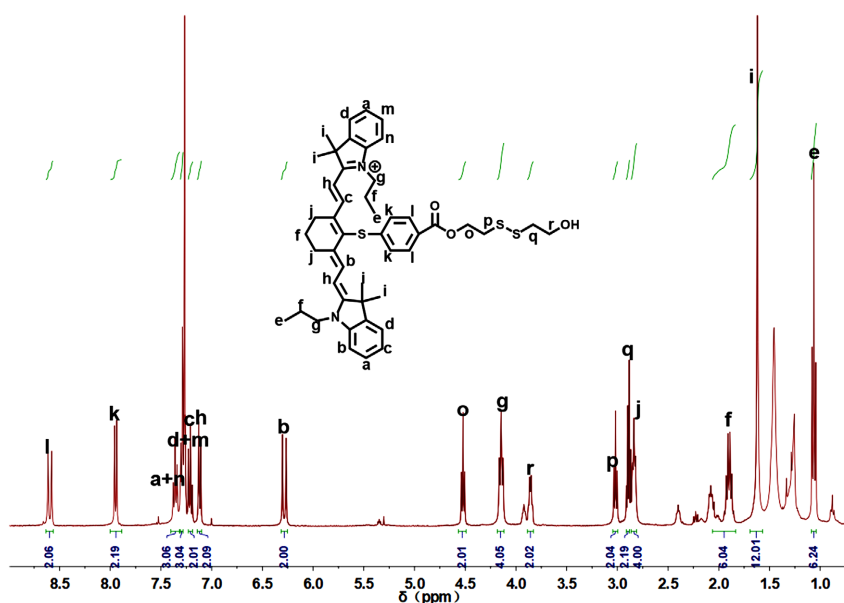


Figure 3.  $^1\text{H NMR}$  spectra of IR806-S-S-OH  
图 3. IR806-S-S-OH 的  $^1\text{H NMR}$  图谱

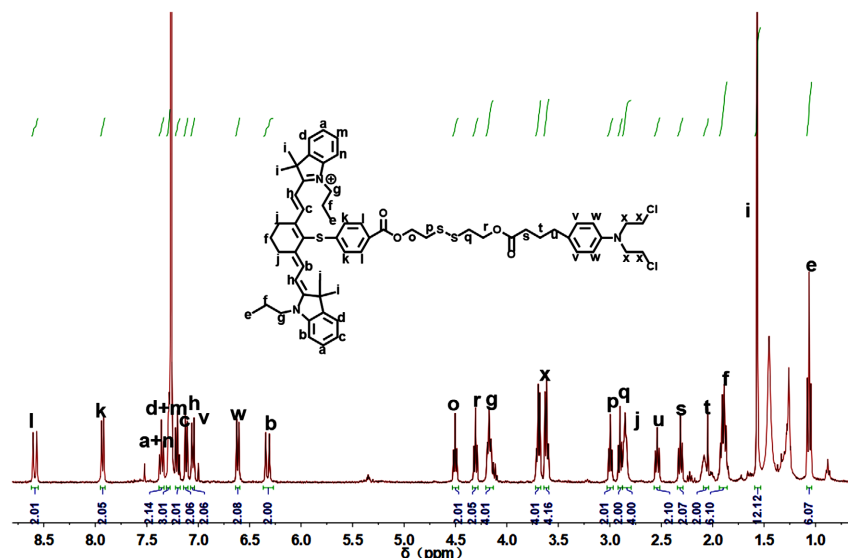


Figure 4.  $^1\text{H}$  NMR spectra of IR806-CB

图 4. IR806-CB 的  $^1\text{H}$  NMR 图谱

超分子纳米前药 SN-IR806/CB 是由末端修饰了环糊精的聚乙二醇(PEG-CD)和偶联药物 IR806-CB 通过环糊精与苯丁酸氮芥之间的主客体识别作用、IR806 之间的  $\pi$ - $\pi$  堆积作用和亲疏水作用力的共同作用下在水中自组装形成。我们通过由透析法制备 SN-IR806/CB, 即将 PEG-CD 和 IR806-CB 溶于 DMF 后, 再缓慢滴加去离子水, 最后通过透析以及冷冻干燥得到超分子纳米前药 SN-IR806/CB 固体。该超分子纳米前药的流体力学粒径和形貌由动态光散射(DLS)和透射电子显微镜(TEM)进行表征。如图 5 所示, 超分子纳米前药 SN-IR806/CB 在水中的流体力学粒径为  $182.9 \pm 3.2$  nm, PDI 为  $0.329 \pm 0.07$ , 其形貌为球形胶束结构, 表明制备得到的超分子纳米前药 SN-IR806/CB 在水中具有较为均一的粒径, 并且该粒径在 200 nm 以内, 适用于 EPR 效应。

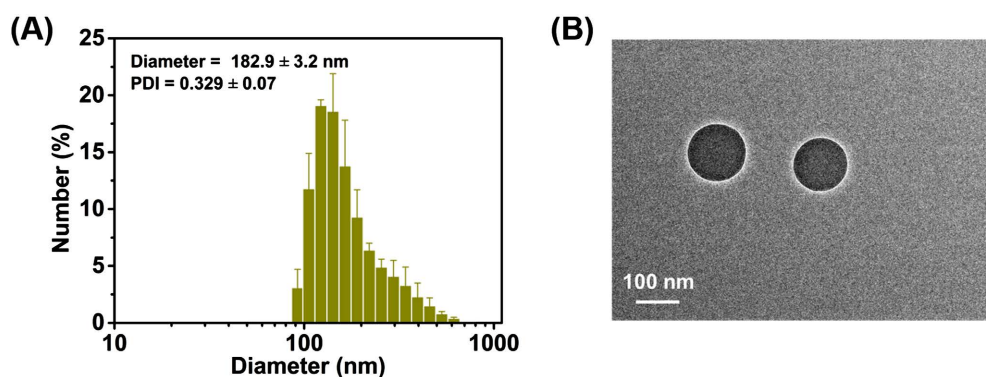


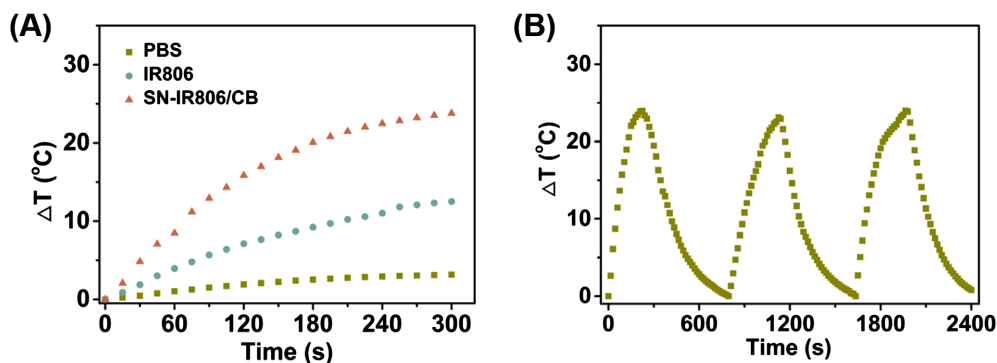
Figure 5. The DLS (A) and TEM (B) data of SN-IR806/CB

图 5. SN-IR806/CB 的 DLS (A)和 TEM (B)数据

### 3.2. 超分子纳米前药 SN-IR806/CB 的光热性能研究

为了研究 SN-IR806/CB 的光热性能, 我们用近红外光(808 nm,  $1.0 \text{ W}/\text{cm}^2$ , 5 min)照射 SN-IR806/CB 的 PBS 溶液, 并用纯 PBS 溶液和 IR806 的 PBS 溶液作为对照组, 分别记录它们的升温情况。如图 6(A)所示, SN-IR806/CB 组于 5 分钟时升温  $26.4^\circ\text{C}$ , 明显高于 PBS 组的  $3.2^\circ\text{C}$  和 IR806 组的  $12.5^\circ\text{C}$ 。这可能是

因为纳米药物中 IR806 通过  $\pi$ - $\pi$  堆积作用有所聚集后可以明显增强其激发热辐射, 同时降低热量的耗散, 形成比游离的 IR806 更高的升温效果。此外, 该升高的温度能够造成肿瘤细胞的不可逆凋亡甚至坏死, 可以用于光热疗法。最后, 通过超分子纳米前药 SN-IR806/CB 的三次升温降温循环曲线观察到其升高的温度基本没有发生变化, 无明显的下降情况, 证明了该超分子纳米前药 SN-IR806/CB 具有很好的光热稳定性(图 6(B))。

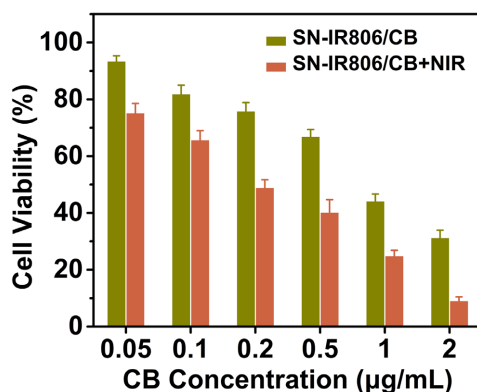


**Figure 6.** (A) The  $\Delta T$  of PBS, IR806 and SN-IR806/CB; (B) The  $\Delta T$  curves of SN-IR806/CB during repeated NIR irradiation on-off cycles

**图 6.** (A) PBS, IR806 和 SN-IR806/CB 的升温曲线; (B) SN-IR806/CB 的光热循环曲线

### 3.3. 超分子纳米前药 SN-IR806/CB 的细胞毒性

最后, 我们选用 HepG2 细胞系研究超分子纳米前药 SN-IR806/CB 的抗肿瘤效果。如图 7 所示, SN-IR806/CB 在没有光照的条件下, 表现出一定的细胞毒性, 这是由于 HepG2 细胞在摄取 SN-IR806/CB 纳米药物后, 在肿瘤细胞内的还原环境中, 纳米药物中的二硫键发生断裂, 释放出化疗药物苯丁酸氮芥 CB, 从而杀死肿瘤细胞, 表现出化疗效果。当用近红外光(808 nm, 1.0 W/cm<sup>2</sup>, 5 min)进行照射后, SN-IR806/CB 表现出更强的细胞毒性, 这是由于纳米药物中的 IR806 在光照条件下, 能够吸收近红外光转换成热能, 使温度升高造成细胞凋亡即光热疗, 并且还可以产生活性氧杀死肿瘤细胞即光动力疗法, 同时上述两种疗法联合苯丁酸氮芥的化疗, 表现出协同的三重治疗效果。



**Figure 7.** The Cytotoxicity of SN-IR806/CB and SN-IR806/CB+NIR determined by MTT

**图 7.** MTT 法测定的 SN-IR806/CB 和 SN-IR806/CB+NIR 的细胞毒性

## 4. 结论

本文通过二硫键链接光敏剂 IR806 和化疗药物苯丁酸氮芥 CB 合成了还原响应性的偶联药物 IR806-

CB, 其与聚乙二醇-环糊精通过主客体识别作用、 $\pi$ - $\pi$  堆积作用和亲疏水作用力的共同作用下构建了超分子纳米前药 SN-IR806/CB。该超分子纳米前药具有很好的生物相容性, 其前药结构能够显著提高纳米药物的稳定性, 避免药物过早泄露, 减少药物的毒副作用。在通过 EPR 效应富集到肿瘤部位后, 通过内吞作用进入到肿瘤细胞内, 在还原物质谷胱甘肽的作用下, 二硫键断裂, 释放出化疗药物苯丁酸氮芥, 产生化疗效果, 同时在近红外光的作用下, 组分 IR806 能够使温度升高并释放出毒性物质活性氧, 产生光热疗和光动力治疗的抗肿瘤效果, 三种治疗方式在细胞内形成协同治疗效果, 显著提高了超分子纳米前药 SN-IR806/CB 的疗效。该超分子纳米前药为构建高效的抗肿瘤纳米药物体系提供了新的思路。

## 基金项目

本研究由南通市社会民生科技计划(项目编号: MS2023040)支持。

## 参考文献

- [1] Ding, Y., Wang, C., Ma, Y., Zhu, L., Lu, B., Wang, Y., *et al.* (2022) pH/ROS Dual-Responsive Supramolecular Polypeptide Prodrug Nanomedicine Based on Host-Guest Recognition for Cancer Therapy. *Acta Biomaterialia*, **143**, 381-391. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2022.03.004>
- [2] Chen, P., Huang, P., Chen, J., Shi, Q., Zhu, Y., Chen, Y., *et al.* (2022) A Self-Delivery Chimeric Peptide for High Efficient Cell Membrane-Targeting Low-Temperature Photothermal/Photodynamic Combinational Therapy and Metastasis Suppression of Tumor. *Biomaterials*, **286**, Article ID: 121593. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2022.121593>
- [3] Zhang, F., Zhu, G., Jacobson, O., Liu, Y., Chen, K., Yu, G., *et al.* (2017) Transformative Nanomedicine of an Amphiphilic Camptothecin Prodrug for Long Circulation and High Tumor Uptake in Cancer Therapy. *ACS Nano*, **11**, 8838-8848. <https://doi.org/10.1021/acs.nano.7b03003>
- [4] Lu, B., Zhang, Z., Ji, Y., Zhou, S., Jia, B., Zhang, Y., *et al.* (2022) Icing on the Cake: Combining a Dual PEG-Functionalized Pillararene and an A-D-A Small Molecule Photosensitizer for Multimodal Phototherapy. *Science China Chemistry*, **65**, 1134-1141. <https://doi.org/10.1007/s11426-022-1232-9>
- [5] Huang, L., Zhao, S., Fang, F., Xu, T., Lan, M. and Zhang, J. (2021) Advances and Perspectives in Carrier-Free Nanodrugs for Cancer Chemo-Monotherapy and Combination Therapy. *Biomaterials*, **268**, Article ID: 120557. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120557>
- [6] Cheetham, A.G., Chakroun, R.W., Ma, W. and Cui, H. (2017) Self-Assembling Prodrugs. *Chemical Society Reviews*, **46**, 6638-6663. <https://doi.org/10.1039/c7cs00521k>
- [7] Li, X., Zhang, Y., Ma, Z., He, C., Wu, Y. and An, Q. (2019) Designing Cancer Nanodrugs That Are Highly Loaded, Ph-Responsive, Photothermal, and Possess a Favored Morphology: A Hierarchical Assembly of DOX and Layer-by-Layer Modified RGO. *Chinese Chemical Letters*, **30**, 489-493. <https://doi.org/10.1016/j.ccl.2018.03.019>
- [8] Hu, D., Pan, M., Yang, Y., Sun, A., Chen, Y., Yuan, L., *et al.* (2021) Trimodal Sono/Photoinduced Focal Therapy for Localized Prostate Cancer: Single-Drug-Based Nanosensitizer under Dual-Activation. *Advanced Functional Materials*, **31**, Article ID: 2104473. <https://doi.org/10.1002/adfm.202104473>
- [9] Chen, H., Zeng, X., Tham, H.P., Phua, S.Z.F., Cheng, W., Zeng, W., *et al.* (2019) NIR-Light-Activated Combination Therapy with a Precise Ratio of Photosensitizer and Prodrug Using a Host-Guest Strategy. *Angewandte Chemie International Edition*, **58**, 7641-7646. <https://doi.org/10.1002/anie.201900886>
- [10] Yan, S., Zeng, X., Tang, Y., Liu, B., Wang, Y. and Liu, X. (2019) Activating Antitumor Immunity and Antimetastatic Effect through Polydopamine-Encapsulated Core-Shell Upconversion Nanoparticles. *Advanced Materials*, **31**, Article ID: 1905825. <https://doi.org/10.1002/adma.201905825>
- [11] Wang, Y., Xia, S., Li, H. and Wang, J. (2019) Unprecedentedly Tough, Folding-Endurance, and Multifunctional Graphene-Based Artificial Nacre with Predesigned 3D Nanofiber Network as Matrix. *Advanced Functional Materials*, **29**, Article ID: 1903876. <https://doi.org/10.1002/adfm.201903876>
- [12] Tong, C., Zhong, X., Yang, Y., Liu, X., Zhong, G., Xiao, C., *et al.* (2020) PB@PDA@Ag Nanosystem for Synergistically Eradicating MRSA and Accelerating Diabetic Wound Healing Assisted with Laser Irradiation. *Biomaterials*, **243**, Article ID: 119936. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.119936>
- [13] 马宇轩, 于威, 朱吕明, 丁月. 刺激响应性聚肽纳米材料及其肿瘤药物递送中的应用[J]. 纳米技术, 2021, 11(3): 184-190.