

• 未来药物 •

血脑屏障内低密度脂蛋白受体相关蛋白-1 受体的靶向新型多肽 ANG1005

曹政红^{1,2}, 龚 珉¹, 兰 静³, 付 刚¹, 郑学敏¹, 徐为人^{1*}

1. 天津药物研究院 天津市新药设计与发现重点实验室, 天津 300193

2. 天津中医药大学, 天津 300193

3. 天津市药品审评中心, 天津 300191

摘 要: 很多抗癌药物由于血脑屏障的限制对脑瘤作用比较差, 不利于药物的吸收。紫杉醇是二萜类天然产物, 其在体外能有效地抑制恶性脑胶质瘤的生长, 但并不能显著提高恶性脑胶质瘤患者存活时间, 其原因主要是紫杉醇在血浆中消除太快, 血脑屏障渗透能力差等导致肿瘤部位吸收过低。为了解决这个问题, 一种可靶向低密度脂蛋白受体相关蛋白-1 (LRP-1) 的 19 个氨基酸的肽 Angiopep-2 与 3 分子紫杉醇结合构成 ANG1005, ANG1005 与 LRP-1 结合作用后可以促使受体介导的药物通过跨细胞转运进入脑组织中。

关键词: ANG1005; Angiopep-2; 紫杉醇; 低密度脂蛋白受体相关蛋白-1; 血脑屏障; 脑瘤

中图分类号: R97 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674 - 5515(2012)04 - 0396 - 04

ANG1005, a new type polypeptide targeted low-density lipoprotein receptor-related protein 1 in blood-brain barrier

CAO Zheng-hong^{1,2}, GONG Min¹, LAN Jing³, FU Gang¹, ZHENG Xue-min¹, XU Wei-ren¹

1. Tianjin Key Laboratory of Molecular Design and Drug Discovery, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

2. Tianjin University of Tradition Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

3. Tianjin Center for Drugs Evaluation, Tianjin 300191, China

Abstract: Owing to the limit of the blood-brain barrier (BBB) many anticancer drugs have undesirable effect on brain tumors with less benefit for drug absorption. Paclitaxel, a natural product belonging to diterpene, could effectively inhibit the growth of malignant glioma and brain metastases *in vitro*. However it could not significantly improve survival time of patient suffered from malignant glioma. The main reason is that paclitaxel is eliminated too fast in the plasma and the BBB penetration ability is too low causing lower absorption at tumor sites. To overcome this problem, a targeted low-density lipoprotein (LDL) receptor-related protein-1 (LRP-1) of 19-amino acid peptide Angiopep-2 and three molecular paclitaxel constitute ANG1005. After combination of ANG1005 and LRP-1, receptor-mediated drugs could be promoted to brain tissue through cell transportation.

Key words: ANG1005; Angiopep-2; paclitaxel; low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1); blood brain barrier (BBB); brain tumors

1 药物概况

通用名: ANG1005

相对分子质量: 5 109

原研公司: Menlo Park, CA

结构见图 1。

目前研发阶段: II 期临床

给药途径: 静脉注射

适应症: 原发性脑癌以及乳癌和肺癌脑转移等

常见癌症

2 相关背景

收稿日期: 2011-11-28

作者简介: 曹政红 (1987—), 女, 山东省临沂市人, 天津中医药大学中药学专业在读研究生, 研究方向为生物药合成及药理学。

Tel: 13920790306 E-mail: caozhenghong1987@163.com

*通讯作者 徐为人, 研究员, 博士生导师。Tel: (022) 23006862 E-mail: xuwr@tjipr.com

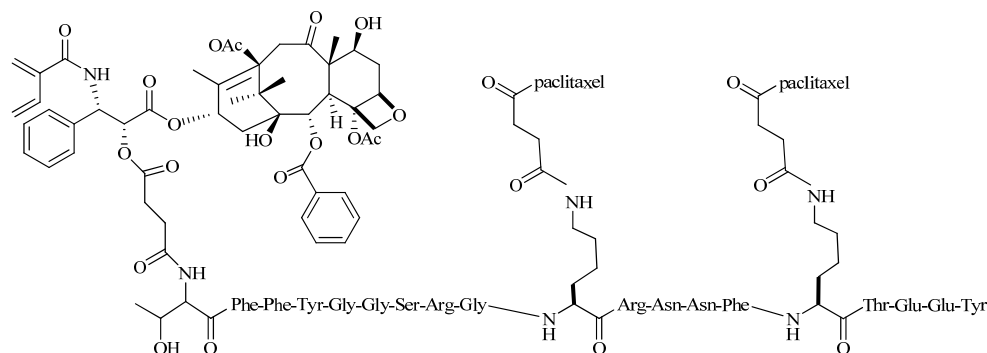


图 1 ANG1005 的结构

Fig. 1 Structure of ANG1005

脑瘤的治疗仍是肿瘤学最大的挑战, 多形性胶质细胞瘤和恶性胶质瘤侵略性最强的脑瘤, 其能快速增殖、渗透影响周围的正常组织。经调查, 放射性治疗与化学疗法只能延长患者生命 4 个月^[1]。现在化学疗法等效果差的原因一部分是由于血脑屏障的存在, 其由一系列单层的脑血管上皮细胞连接而成, 能通过血脑屏障的溶质需能溶解并渗透到脂质上皮细胞膜或者有载体的协助。但大多数抗癌药物由血液渗透进入中枢神经系统都受到限制^[2]。

Angiopep-2 的相对分子质量为 2.4×10^4 , 是一种新型多肽, 由 TFFYGGSRGKRNNFKTEEY 19 个氨基酸构成, 可以通过血脑屏障上表达的低密度脂蛋白受体相关蛋白-1 (LRP-1) 受体介导内吞进入脑组织, LRP-1 为血脑屏障表面高表达的一种受体, 研究表明, 人脑胶质瘤细胞都能表达 LRP-1 受体^[3]。

紫杉醇是二萜类天然产物, 从红豆杉科红豆杉属东北红豆杉 *Taxus cuspidata* Siebold et Zucc. 树皮中提取分离得到的一种最有效的抗肿瘤药物之一, 研究表明, 紫杉醇在体外能有效地抑制恶性脑胶质瘤与脑转移的生长^[4], 但并不能显著提高恶性脑胶质瘤病人存活时间, 其原因主要是紫杉醇在血浆中消除太快, 血脑屏障渗透能力差等导致肿瘤部位吸收过低。血脑屏障渗透性低是由于流出泵 P-糖蛋白 (P-gp) 在脑上皮细胞顶膜多药耐药性的表达^[5]。P-gp 的表达限制了紫杉醇进入正常状态的脑和脑肿瘤。已经研究了不同方案来增加紫杉醇运输到脑部, 如扩散性的药物释放埋植剂和药物释放纳米技术^[6]。

ANG1005 (又名 GRN1005) 是一种可靶向 LRP-1 的肽 Angiopep-2 与 3 分子紫杉醇结合构成。ANG1005 与 LRP-1 结合作用后可以促使受体介导的药物通过跨细胞转运进入脑组织中^[7]。研究表明, ANG1005 促进跨细胞作用, 显著性地提高神经胶质

瘤和脑转移原位模型的成活率。大脑摄取 ANG1005 明显高于紫杉醇; ANG1005 抗增殖活性并不需要紫杉醇的释放, 而且仍能维持微管稳定的能力。

3 药物合成

肽 Angiopep-2 有 3 个部位可以结合 2'-N-琥珀酰亚胺-紫杉醇。通过可以拆开的酯链将紫杉醇连接到 Angiopep-2 上。反应在含 68% 二甲基亚砜 (DMSO) 的 Ringer's 溶液中进行, 调 pH 值至 7.2, 加热到 121 °C, 反应 24 h^[8]。简单的说, 就是制备紫杉醇与 Angiopep-2 的结合物, 合成路线见图 2。

4 药理学研究

用原位鼠脑灌注技术研究雄性 SD 大鼠 (200~250 g) 脑通过血脑屏障摄取 ^{125}I -ANG1005、 ^{125}I -angiopep-2 和 ^3H -紫杉醇的量^[9]。结果表明, 大脑总体摄取结合物 ANG1005 的量是单独紫杉醇的 4.5 倍^[10-11], 而且考虑到每个 ANG1005 分子含 3 个紫杉醇, 因此大脑的摄取量远不止这些。

CD-1 裸小鼠每天尾静脉快速注射紫杉醇, 给药方式和给药剂量都一样, 19 d 后注射紫杉醇和 ANG1005 的肿瘤分别为 483、236 mm³, 而对照组的肿瘤大小为 845 mm³。结果充分显示, ANG1005 治疗肿瘤的有效性。

摄取 [^3H]紫杉醇和 [^3H]ANG1005 用 P-gp 过表达 MDCK-MDR1 接种在 24 孔板来研究药物的蓄积。细胞用 PBS 洗 3 次, 加入培养基, 培养基无血清, 含 P-gp 抑制剂环孢霉素 A (10 μmol/L), 置于 37 °C 孵育 30 min。然后加入有放射性标志的分子 50 nmol/L 放置 60 min。细胞快速用冷的 PBS 洗 3 遍, 然后用 0.1 mol/L NaOH 500 μL 溶解。固定在细胞上的放射性分子的总数用 β-闪烁计数法进行测试。结果表明, 摄取 [^3H]ANG1005 的环孢霉素 A 的量没有区别, 相比摄取 [^3H]紫杉醇的环孢霉素 A 是其 3 倍。

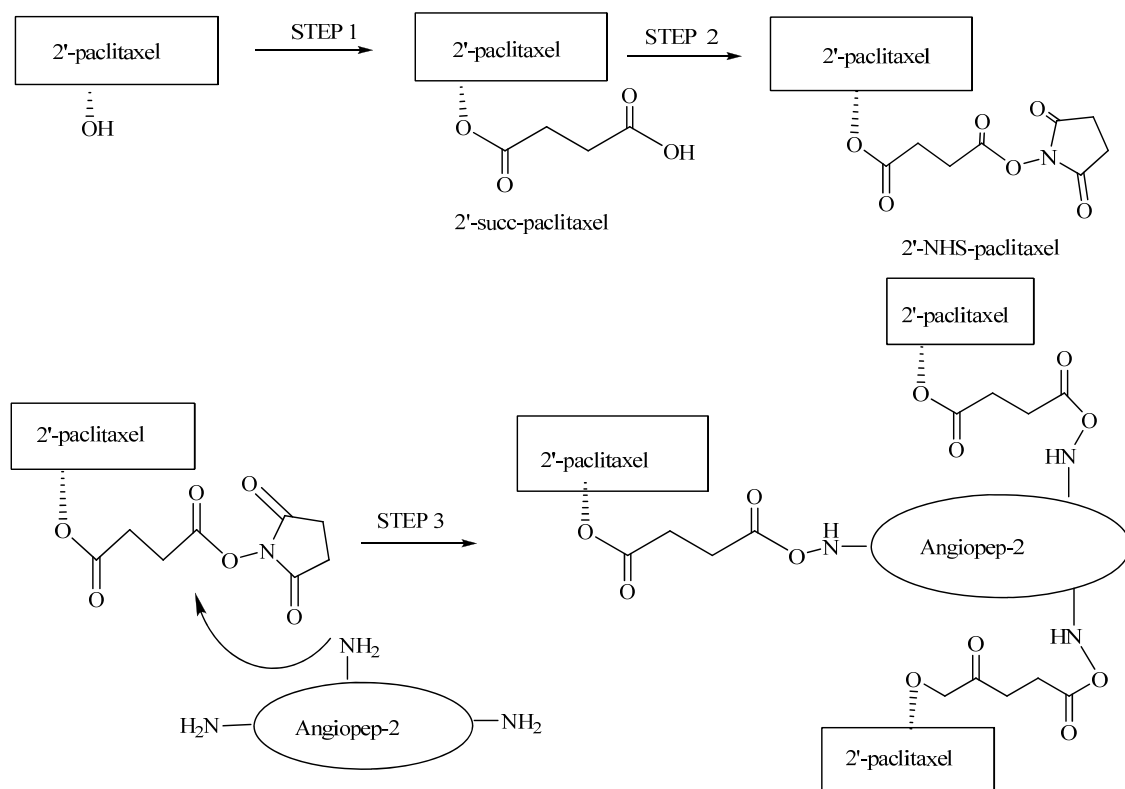


图 2 ANG1005 的合成

Fig. 2 Synthesis of ANG1005

关于体外细胞毒性试验的研究,在 96 孔板培养肿瘤细胞,每个孔含 5 000 个细胞。加入紫杉醇或 ANG1005 培养 48 h,培养基被消耗,用含 2 $\mu\text{Ci/mL}$ [甲基- ^3H]胸腺嘧啶脱氧核苷培养基在 37 $^{\circ}\text{C}$ 2 h 进行标记。吸出细胞放在 MicroBeta 计数仪来确定氚的摄取。作为对照,ANG1005 用含血清的培养基在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 48 h。结果证实了 ANG1005 比较高的细胞毒性活性,其 IC_{50} 值在 2.7~8.3 nmol/L。在恶性胶质瘤、肺癌和卵巢癌细胞系中,相对于紫杉醇而言,ANG1005 有较强的活性。

5 临床研究^[12]

5.1 I 期临床

一项临床研究中,先天实体瘤和脑转移患者 56 名,平均年龄 54 岁 (23~81 岁),其中男性 24 名,静脉给药 ANG1005,剂量为 30~700 mg/m^2 ,其中 20 名患者给药剂量为 650 mg/m^2 (研究已证实该剂量是其最大耐受剂量值)。最常出现的不良反应有白细胞减少 (73%)、嗜中性白细胞减少 (66%)、贫血 (48%)、血小板减少 (27%) 和疲劳 (18%),不过这些反应都是暂时可以控制的。剂量范围内最大允许毒性是 4 级血小板减少症。即使是接受过多次剂量的患者也没有数据显示中枢神经系统毒性或者

产生抗体。只有 4 名患者出现由于静脉注射引起的反应,研究中没出现明显的周围神经病变。药动学数据显示 ANG1005 的生物利用度呈线性关系,重复给药后也没出现药物蓄积作用。20 名患者注射剂量为 650 mg/m^2 一个循环后:最大血药浓度为 306 $\mu\text{g/mL}$,曲线下面积为 2 571 $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$,半衰期为 4.0 h,CL 为 285 $\text{mL/m}^2\cdot\text{h}$ 。在最大耐受剂量时测定的血浆浓度中游离的紫杉醇的量显示只有一小部分血浆成分 (<8%) 暴露。在给药剂量大于 420 mg/m^2 时全部疾病控制率达到 71%。结果表明位于脑、肝、肺、淋巴结部位的转移性肿瘤显著减少。在用药 8 周后对所有患者都有效果。本研究则证实 ANG1005 强有效的活性,同时也证实了 ANG1005 良好的耐药性和安全性。

在一项再发性恶性胶质瘤的临床研究中,共 63 名患者,平均年龄 50 岁 (22~78 岁),其中男性 36 名。采用静脉给药 ANG1005,剂量为 30~700 mg/m^2 ,其中 18 名患者给药剂量为 650 mg/m^2 (最大耐受剂量值)。最常出现的不良反应有嗜中性白细胞减少 (51%)、白细胞减少 (46%)、疲劳 (21%),标准治疗这些反应都是暂时性的可以控制的。剂量范围内最大允许毒性是 3 级黏膜炎。没有数据显示

中枢神经系统毒性或者抗体产生。药动学数据显示 ANG1005 的生物利用度呈线性关系,重复给药后也没出现药物蓄积作用。静脉给药 4~6 h 后,在恶性胶质细胞瘤组织中测出了 ANG1005 的治疗剂量。另外研究表明,当放在链孢红素中培养也不会再生长。18 名患者注射剂量为 650 mg/m²,一个循环后最大血药浓度为 378 μg/mL,曲线下面积为 3 198 μg·h/mL,半衰期为 4.12 h,CL 为 230 mL/m²·h。在给药剂量大于 300 mg/m²时全部疾病控制率能达到 61%。在用药 6 周后几乎对所有患者都有效果。研究证实 ANG1005 有良好的耐药性和安全性,对再发性恶性胶质瘤有显著的治疗作用。

5.2 II 期临床

目前 ANG1005 处于多项 II 期临床测试,正在研究通过早期观察和鉴定相关的病人种群来证实 ANG1005 的临床活性,对 ANG1005 治疗肿瘤的安全性、有效性、稳定性等进一步研究。

6 结语

癌症是一类严重威胁人类健康的多发病和常见病,近 30 年来癌症发病率和死亡率一直呈上升的趋势。ANG1005 含有 3 个紫杉醇和 Angiopep-2,静脉注射 30 min 后脑部摄取的药物有效成分的部位比单纯紫杉醇多至少 161 个褶^[13]。这些结果显示,脑摄取比较差的药物例如紫杉醇,结合上一种载体如 Angiopep-2 能显著地增加药物在大脑中的分布,而且许多肿瘤细胞显示出能增加低密度脂蛋白受体相关蛋白的表达。另外,紫杉醇与 Angiopep-2 结合克服了主动流出机制,如 P-gp^[14]。ANG1005 代表着一种新的药物研究策略,凭借着这类药物脑转移不用外科手术就可以治疗。进一步研究将表明 ANG1005 单独给药或配合放射治疗都很有疗效,其有效性、安全性、性价比等将是进一步研究的重点和关键,其在未来脑瘤药物市场中占据重要地位。

参考文献

- [1] Chang S M, Butowski N A, Sneed P K, *et al.* Standard treatment and experimental targeted drug therapy for recurrent glioblastoma multiforme [J]. *Neurosurg Focus*, 2006, 20(E4):1-6.
- [2] Deeken J F, Loscher W. The blood-brain barrier and cancer: transporters, treatment, and Trojan horses [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13: 1663-1674.
- [3] Maletinska L, Blakelye A, Bjornstadk A, *et al.* Human glioblastoma cell line: levels of low-density lipoprotein receptor and low-density lipoprotein receptor-related protein [J]. *Cancer Res*, 2000, 60: 2300-2303.
- [4] Cahan M A, Walter K A, Colvin O M, *et al.* Cytotoxicity of taxol *in vitro* against human and rat malignant brain tumors [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1994, 33(5): 441-444.
- [5] Breedveld P, Beijnen J H, Schellens J H M. Use of P-glycoprotein and BCRP inhibitors to improve oral bioavailability and CNS penetration of anticancer drugs [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2006, 27(1): 17-24.
- [6] Tanner P G, Holtmannspotter M, Tonn J C, *et al.* Effects of drug effects of drug efflux on convection-enhanced paclitaxel delivery to malignant gliomas: technical note [J]. *Neurosurgery*, 2007, 61: E880-E882.
- [7] Demeule M, Currie J, Bertrand Y, *et al.* Involvement of the low-density lipoprotein receptor-related protein in the transcytosis of the brain delivery vector angiopep-2 [J]. *J Neurochem*, 2008, 106(4): 1534-1544.
- [8] Régina A, Demeule M, Ché C, *et al.* Antitumour activity of ANG1005, a conjugate between paclitaxel and the new brain delivery vector Angiopep-2 [J]. *Br J Pharmacol*, 2008, 155(2): 185-197.
- [9] Thomas F C, Taskar K, Rudraraju V, *et al.* Uptake of ANG1005, a novel paclitaxel derivative, through the blood-Brain Barrier into brain and experimental brain metastases of breast cancer [J]. *Pharm Res*, 2009, 26(11): 2486-2494.
- [10] Dagenais C, Rousselle C, Pollack G M, *et al.* Development of an *in situ* mouse brain perfusion model and its application to mdrla P-glycoprotein-deficient mice [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2000, 20: 381-386.
- [11] Demeule M, Poirier J, Jodoin J, *et al.* High transcytosis of melanotransferrin (P97) across the blood-brain barrier [J]. *J Neurochem*, 2002, 83(4): 924-933.
- [12] Kurzrock R, Gabrail N, Chandhasin C, *et al.* Safety, pharmacokinetics, and activity of GRN1005, a novel conjugate of angiopep-2, a peptide facilitating brain penetration, and paclitaxel, in patients with advanced solid tumors [J]. *Mol Cancer Ther*, 2011, 11: 308-316.
- [13] Kalvass J C, Maurer T S, Pollack G M. Use of plasma and brain unbound fractions to assess the extent of brain distribution of 34 drugs: Comparison of unbound concentration ratios to *in vivo* P-glycoprotein efflux ratios [J]. *Drug Metab Dispos*, 2007, 35(4): 660-666.
- [14] Demeule M, Régina A, Ché C, *et al.* Identification and design of peptides as a new drug delivery system for the brain [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2008, 324(3): 1064-1072.