

肿瘤靶向的硼携带剂在硼中子 俘获治疗中的应用与发展

陈 奎^{1,2}, 吕林雯^{1,2}, 邢更妹^{1,2,*}

1. 中国科学院 高能物理研究所, 北京 100049; 2. 散裂中子源科学中心, 广东 东莞 523808

摘要: 硼中子捕获疗法 (boron neutron capture therapy, BNCT) 作为一种前景广阔的恶性肿瘤治疗方法已经进入临床。硼药的肿瘤靶向是实现 BNCT 的二元细胞级精准靶向治疗的前提。基于肿瘤细胞表面特异性/差异性表达受体介导的选择性识别、靶向和富集是目前硼药靶向递送研究的焦点, 同时还衍生出了一些精准靶向细胞器的其他靶向递送策略。本文在此分别从小分子硼药和纳米硼药的研发过程, 解析了 BNCT 硼药靶向和递送方法的选择、挑战及其改进方案。新技术、新方法和新思路为未来分子靶向硼药、多靶向硼药的发展提供巨大的便利, 包括: 依赖组学技术的靶点寻找, 依赖机器学习的靶向分子设计和优化, 以及基于这些靶点库和靶向分子库搭建的模块化硼核的建立。

关键词: BNCT; 肿瘤靶向; 硼药; 硼携带剂; 纳米

中图分类号: TL923; R817.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-9950(2023)06-0487-12

doi: 10.7538/hhx.2023.45.06.0487

Application and Development of Tumor-Targeting Boron Carriers in Boron Neutron Capture Therapy

CHEN Kui^{1,2}, LYU Lin-wen^{1,2}, XING Geng-mei^{1,2,*}

1. Institute of High Energy Physics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

2. Spallation Neutron Source Science Center, Dongguan 523808, China

Abstract: Boron neutron capture therapy (BNCT) is a promising therapeutic method for malignant tumors and has entered the clinical trials. As a binary cellular accurate therapy, BNCT relies on tumor-targeting boron delivery. It is intriguing for boron delivery design that selective recognition, target, and accumulation are based on specific or differential expression receptors on the tumor cell surface. Several delivery strategies targeting other subcellular organelles have also emerged. Here, we summarized the selection, challenges, and improvement of boron targeting delivery methods in small molecule boron drugs and boron-containing nanoparticles. In the future, new technologies, new methods, and new ideas include target receptors finding via omics, ligands optimization via machine learning,

收稿日期: 2023-01-16; **修订日期:** 2023-04-18

基金项目: 国家自然科学基金 (12105312, 31971294); 粤莞联合基金 (2021B1515120037, 2021B1515140042); 粤港澳中子散射科学和技术联合实验室开放课题 (E1905DHT)

* **通信联系人:** 邢更妹

and establishment of modular boron cores based on receptors and ligands libraries, thereby provide great convenience for the development of molecular-targeted boron drugs and multi-targeted boron drugs.

Key words: BNCT; tumor-targeting; boron agent; boron carrier; nano

1 肿瘤靶向的硼中子俘获治疗

放射治疗是肿瘤治疗的三种经典方法之一,尤其是近年快速发展高线性能量转移(high linear energy transfer, high-LET)放射治疗方法(重离子和中子俘获治疗),其细胞周期状态依赖性小、辐射抗性产生比率相对较低等显著优势^[1-3],为化疗和X射线放疗等耐受的恶性肿瘤的治疗提供了途径。世界卫生组织国际癌症研究机构(IARC)发布的2020年全球最新癌症负担数据显示,2020年中国新发癌症病例457万例,已经成为“癌症大国”。我国恶性肿瘤的5年相对生存率约为40.5%,与发达国家还有很大差距。重离子和中子俘获治疗等,具有提高恶性肿瘤治疗效果的明显优势。硼中子俘获治疗^[4-5](也称硼中子捕获治疗, boron neutron capture therapy, BNCT)是一种基于¹⁰B和热中子相互作用的二元治疗体系。非放射性同位素¹⁰B原子中子俘获截面为3 835 b(1 b = 10⁻²⁸ m²),高出机体其他元素3个数量级。¹⁰B吸收低能热中子(<0.5 eV),发生核反应(¹⁰B(n, α)⁷Li),产生α粒子(⁴He)和反冲的锂原子核(⁷Li)。其中α粒子的穿透距离很短,只有4~9 μm,与细胞的直径接近。因此,将¹⁰B选择性递送至肿瘤细胞俘获热中子,可以实现对肿瘤细胞的特异性杀伤,避免对邻近正常细胞的损伤^[6]。BNCT对肿瘤细胞的DNA的损伤是直接的、不易修复的,而且不依赖于细胞周期状态,因此,极大降低了辐射抗性的产生。BNCT不仅在一些中枢神经系统的恶性肿瘤和额面部肿瘤治疗中已经取得显著疗效,同时对一些解剖结构特殊且难治的实体瘤也显示了非常好的疗效(如生殖器肿瘤)^[7-9]。

理想的BNCT治疗,是实现单个肿瘤细胞的精确杀伤,而不损伤正常细胞,这与传统放疗和化疗的治疗逻辑有所不同^[10-11]。最大化的实现BNCT的物理-生物-治疗效应,需要¹⁰B化合物选择性地积累在肿瘤细胞达到足够高的蓄积浓度(质量分数>20×10⁻⁶)。同时,在正常脏器和组织中的蓄积较少(肿瘤和正常组织的硼浓度比值

(T/N)>3,肿瘤与血液的硼浓度比值(T/B)>3)。由此可见,硼药在肿瘤中的特异性靶向蓄积是实现肿瘤BNCT治疗目标的关键。

肿瘤靶向治疗(药物的靶向递送和肿瘤的靶点治疗),一直是肿瘤药物的研发热点。这些靶点本质上是调节肿瘤发生发展的特异性分子位点(如信号通路的活化、免疫环境的调整等)^[12]。目前BNCT硼药的肿瘤靶向递送研究主要聚焦于肿瘤细胞表面特异性/差异性表达受体介导的选择性识别、靶向和富集。本文在此重点总结硼药研发过程中,肿瘤靶点和递送方法的选择和挑战,及其改进策略和方案。

2 小分子硼药的肿瘤靶向选择及改进方案

2.1 以L型氨基酸转运体(LAT)为靶点的类氨基酸硼药

L型氨基酸转运体(L-type amino transporters, LAT)是一种与Na⁺和pH值无关的异二聚体氨基酸转运蛋白^[13]。它优先转运大支链和芳香族中性氨基酸进入增殖细胞。包括LAT1、LAT2、LAT3、LAT4四种亚型,其中LAT1在多种人类肿瘤细胞中过表达,与肿瘤细胞快速增殖需要大量吸收和重吸收氨基酸有关,也与肿瘤分期、肿瘤组织血管生成及肿瘤患者的预后等病理进程密切相关^[13]。此外,作为跨越血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)的氨基酸的主要转运蛋白, LAT1对氨基酸的转运,也是保证正常大脑完成其生理功能所必须的^[14]。因此,许多需要进入中枢神经系统的药物设计与LAT1的内源性底物具有高度结构相似性,通过降解修饰由LAT1转运入脑^[15]。

1) 以LAT1为靶点的首个临床硼药:BPA

2020年5月,日本厚生省批准了首个用于BNCT临床治疗的硼药——硼法伦(Borofalan [¹⁰B],“Steboronine[®]”)。它的主要成分为(L)-4-二羟基硼基苯丙氨酸(boronophenylalanine, BPA),是中性氨基酸苯丙氨酸的衍生物。BPA依赖LAT1选择性转运进入细胞^[15],参与特定蛋白质的合成^[16]。由于其结构与酪氨酸(Tyr)类似,可

以作为酪氨酸酶的底物,通过黑色素代谢途径合成大分子,因此 BPA-BNCT 首先被用于治疗皮肤黑色素瘤^[17]。此外,由于 BPA 可以通过 LAT1 穿过 BBB^[18],也被广泛用于头颈部恶性肿瘤的 BNCT。

但是, LAT1 具有双向转运能力,为维持细胞的生理需要和平衡,也会将细胞内 BPA 与细胞外氨基酸交换,导致 BPA 的外排^[19]。然而, BNCT 通常需要 30~60 min 的热中子照射, BPA 在肿瘤细胞内浓度的持续降低,影响治疗效果^[20]。因此硼法伦在 BNCT 临床治疗中,采用了持续静脉滴注给药以维持较高的瘤内硼浓度^[21]。但这也增加了 BNCT 的潜在风险,同时影响治疗效果。

为此,日本学者 Nomoto 等^[22]构建合成了聚乙烯醇(PVA)与 BPA 的硼酸酯复合物(PVA-BPA 复合物)(图 1)。当通过 LAT1 转运进入肿瘤细胞,该复合物可以在细胞内体/溶酶体中积累,降低胞质中 BPA 的含量,减缓 LAT1 介导的

BPA 外排,实现在皮下肿瘤中较长时间滞留,提升了 BNCT 的治疗效果。以此为基础,他们进一步构建了 BPA 和果糖修饰聚乙二醇-聚(L-赖氨酸)——PEG-P[Lys/Lys(fructose)]-BPA 复合物^[23],该复合物可以通过 LAT1 转运进入肿瘤细胞,同时抑制 LAT1 介导的 BPA 外排。此外,该复合结构的阳离子骨架结果促进其肾脏清除效率,增加了在模型鼠中分布的 T/B 和 T/N 比。通过 BNCT 实验,进一步证实了聚合物-BPA 策略的有效性。

2) 以 LAT 为靶点的其他含硼类氨基酸化合物除 BPA 之外,刘志博团队^[24]在 2015 年构建了一类由三氟硼酸根基团($-\text{BF}_3^-$)替代羧酸根基团($-\text{COO}^-$)的类氨基酸结构——硼氨酸,可以通过 LAT1 高度特异地转运到肿瘤组织中,并被正常器官和组织快速清除。 ^{18}F 标记进行特异性地肿瘤成像,成像效果优于临床正电子发射断层

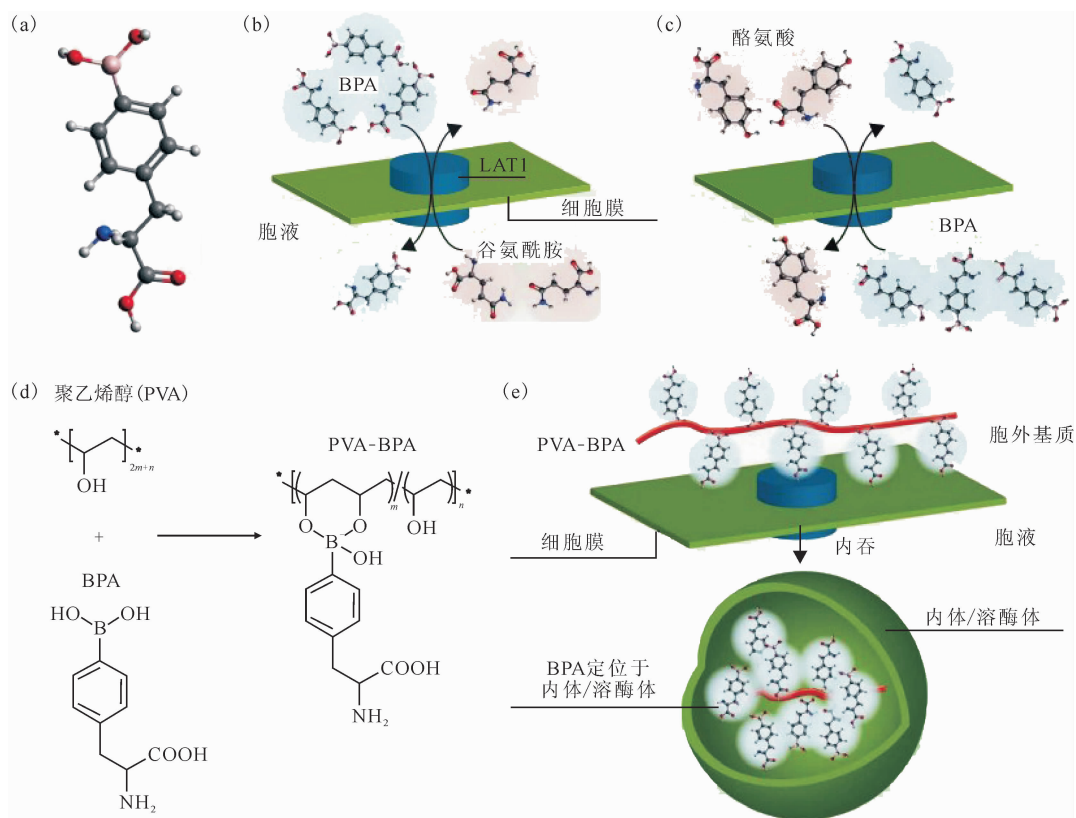
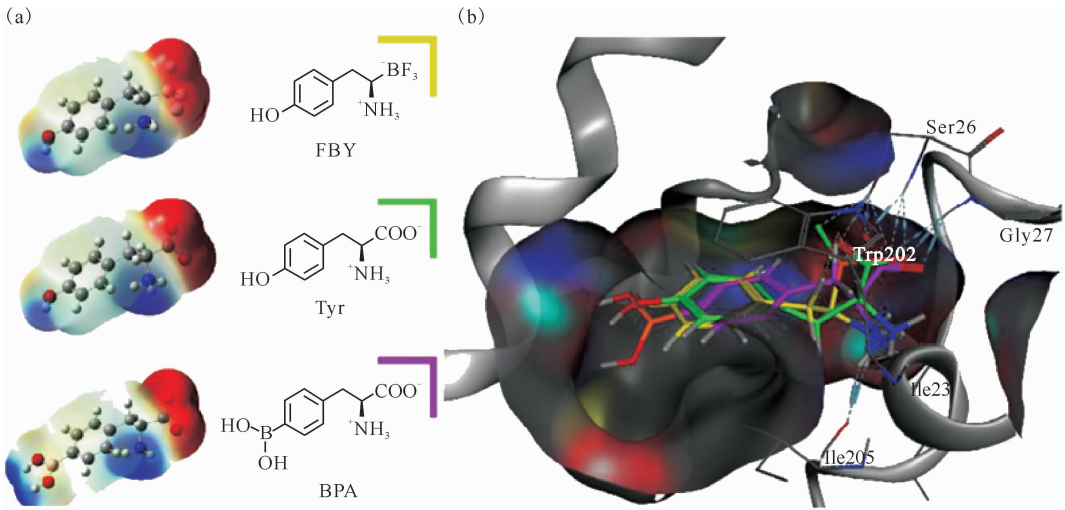


图 1 BPA 细胞摄入和外排示意图^[22]

Fig. 1 Scheme of cell uptake and exertion of BPA^[22]

扫描(PET)示踪剂 ^{18}F -FDG。他们还进一步合成了与BPA结构相似的三氟硼酸的酪氨酸衍生物(FBY)^[25](图2),也可以通过LAT1系统摄取进入肿瘤细胞。黑色素瘤B16F10细胞的特异性摄取浓度可高达 $128\ \mu\text{g}/10^6$ 细胞。在黑色素瘤荷

瘤小鼠模型中BNCT,静脉注射20 mg FBY或BPA-果糖,1 h后中子照射30 min(中子通量为 $1.9\times 10^{12}/(\text{cm}^2\cdot\text{s})$),结果显示,BNCT肿瘤抑制效果FBY优于BPA,显著延长了荷瘤小鼠的生存周期。



(a)——FBY、Tyr 和 BPA 的化学结构和分子静电势图像(蓝色表示正电荷的分布,红色表示负电荷的分布);

(b)——LAT1 和 FBY(黄色)/Tyr(绿色)/BPA(粉色)复合物的预测结构;LAT1(灰色)为实心带状表示,配体和 LAT1 之间的氢键(涉及残基 Trp202、Ser26、Gly27、Ile205 和 Ile23)显示为天空蓝色虚线,已知其高度保守

图2 计算研究表明 FBY 与酪氨酸(Tyr)和 BPA 之间存在高度相似性^[25]

Fig.2 Computational studies show a high degree of similarity between FBY and tyrosine(Tyr) and BPA^[25]

3) 以 LAT 为靶点的巯基十一氢十二烷基钠(BSH)

巯基十一氢十二烷基钠(sodium mercaptoundecahydro-closo-dodecaborate, $\text{Na}_2\text{B}_{10}\text{H}_{11}\text{SH}$, BSH),是一种富含硼原子的多面体硼烷结构,具有良好的化学稳定性和生物相容性^[26]。BSH 能够穿过BBB,富集在脑肿瘤部位,也已经被用于临床脑肿瘤的BNCT治疗研究。然而,由于BSH无法进入肿瘤细胞,BSH的肿瘤靶向性一直备受质疑,也使利用BSH的肿瘤细胞精准BNCT难以实现^[27]。

Futamura 等^[28]将1-氨基-3-氟环丁烷-1-羧酸(ACBC),一种非天然的 α 氨基酸连接到BSH上,实现了LAT介导的肿瘤细胞的特异性靶向性。进一步用 ^{18}F 标记ACBC(^{18}F -ACBC),监测硼药代谢和生物分布。对F98大鼠脑胶质瘤模型治疗研究显示,ACBC-BSH处理后BNCT鼠的中位生存时间为 (44.3 ± 0.8) d,明显优于BSH (37.4 ± 2.6) d。

2.2 基于细胞穿膜肽的BSH靶向选择

细胞穿膜肽(cell-penetrating peptides, CPPs),

又称蛋白质/多肽转导域,是一类以非受体依赖方式、非经典内吞直接穿过细胞膜、进入细胞的多肽分子,它们的长度一般不超过30个氨基酸且富含碱性氨基酸,常带有正电荷。2014年,Michiue等^[29]将BSH连接到多种CPPs(包括HIV-TAT和多聚精氨酸等)上,分别和脑胶质瘤U87MG细胞共孵育,发现细胞中硼蓄积具有时间和浓度依赖性,随着处理时间的延长,BSH可以更多地进入细胞核,有利于增强对肿瘤细胞的杀伤效果,提高BNCT疗效。他们还筛选出了一种含8个BSH结构和聚11精氨酸结构的含硼化合物(8BSH-11R),硼含量达20.1 ppm($1\ \text{ppm}=1\times 10^{-6}$)。给药24 h后,BSH高浓度的蓄积在细胞核中。以10 mmol/L 8BSH-11R处理U87MG细胞,细胞中 ^{10}B 含量达到了 $5\ 623.7\ \text{ng}/10^6$ 细胞。更重要的是,8BSH-11R的BNCT细胞杀伤率比BSH提高了100倍以上。该团队后续进一步优化BSH-CPPs结构,构建了单个BSH偶联3聚精氨酸的BSH-Tmr-3R结构,不仅增加了脑胶质瘤肿瘤细胞摄取,在脑胶质瘤荷瘤鼠模型上实现

了肿瘤靶向和瘤内的均匀分布^[30]。将1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTA)偶联到 BSH-Tmr-3R 上,标记放射性核素⁶⁴Cu,进行 PET 成像,实现了对 BNCT 过程中的硼浓度变化的实时监测。注射后 6 h 和 24 h,T/N 比值分别达到 15.5 和 8.2,T/B 比值分别为 2.8 和 1.9。

3 纳米硼携带剂的肿瘤靶向选择

在以小分子硼化合物为基础的 BNCT 硼药靶向递送研究不断推进的同时,含硼大分子及含硼纳米药物等的设计构建也取得了进展,其中含硼纳米颗粒能够通过被动靶向进入肿瘤组织,利用修饰靶向分子再主动靶向肿瘤细胞表面受体,完成细胞内亚定位,成为 BNCT 新型硼药的研究热点。

3.1 肿瘤 EPR 效应介导被动靶向

EPR 效应是指,由于肿瘤部位血管结构的异常,淋巴回流缺乏,导致大分子药物和纳米颗粒在肿瘤部位具有高渗透性和滞留性现象。EPR 效应自 1986 年提出以来,成为无靶向因子的大分子及纳米药物实现肿瘤部位选择性蓄积的重要机制。也成为构建纳米载药体系,实现药物肿瘤靶向递送的前提条件之一。

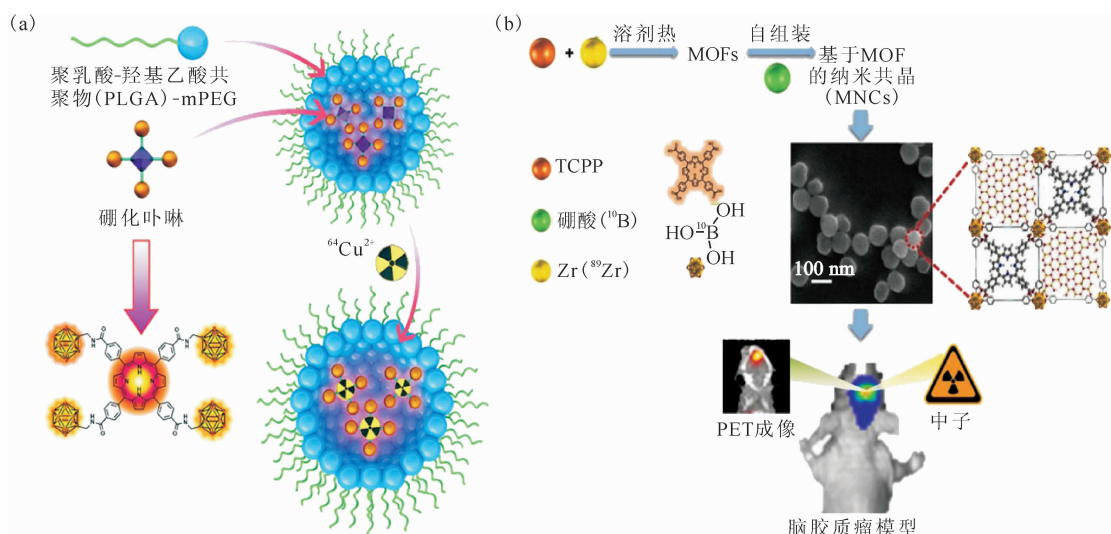
刘志博团队^[31]合成了一种甲氧基-聚乙二醇-聚乙丙交酯的胶束载带硼化卟啉,形成了硼化卟啉复合物(BPN),BPN 依赖 EPR 效应在肿瘤组织

富集(图 3(a))。本课题组^[32]构建了一种基于锆(Zr)和四羧基苯基卟啉(TCPP)的金属有机框架结构、通过主客体反应负载¹⁰B的硼酸(图 3(b))。利用 EPR 效应靶向递送到脑胶质瘤中,实现了体内脑胶质瘤的高硼蓄积(硼质量分数>60 ppm(1 ppm=1×10⁻⁶)),具有一定的 BNCT 应用前景。当然,这类含卟啉结构的纳米药物的靶向是否完全属于 EPR 仍然存在争议,也有人认为卟啉分子可以靶向低密度脂蛋白受体(LDL receptor)来介导纳米药物的肿瘤靶向递送^[33]。

Sumitani 等^[34]合成了聚乙二醇嵌段聚乳酸(PEG-*b*-PLA)多聚物,核心交联碳硼烷形成的含硼胶束也可通过 EPR 效应,实现在肿瘤区域的选择性聚集。文献[35]用苯乙烯-顺丁烯结合葡萄糖胺形成的多聚物,与硼酸形成稳定且水溶性良好的配合物,这种纳米复合体也能够通过 EPR 效应,在肿瘤组织达到十倍于正常组织的硼含量——注射 24 h 后肿瘤组织中¹⁰B 质量分数约为 24×10⁻⁶,同时这种纳米复合体在偏酸性的肿瘤微环境和肿瘤细胞内涵体中,可控释放硼酸阻碍肿瘤细胞糖酵解,协同 BNCT 抑制肿瘤生长,为 BNCT 硼药研发提供了新的思路。

3.2 识别肿瘤细胞表面受体的主动靶向

由于 BNCT 疗效对肿瘤组织中硼浓度的依赖性,纳米药物除了利用 EPR 效应被动靶向肿瘤组织,还因其较大的比表面积,可通过连接靶向分



(a)——甲氧基-聚乙二醇-聚乙丙交酯胶束,载带硼化卟啉^[31];

(b)——TCPP 和锆组装的金属有机框架通过主客体反应负载硼酸形成共结晶,用于脑胶质瘤的 BNCT 和 PET 成像^[32]

图 3 含硼胶束^[31]和含硼共晶示意图^[32]

Fig. 3 Scheme of boron-containing micelles^[31] and boron-containing co-crystal^[32]

子识别肿瘤细胞表面的受体,更高效介导含 ^{10}B 的载药体系进入肿瘤细胞,提高全身给药后的 T/N 比,降低毒副作用,改善 BNCT 的疗效^[36-37]。

1) 利用叶酸受体介导靶向肿瘤细胞

叶酸受体在多种肿瘤细胞表面高表达,已经成为一种重要的肿瘤治疗靶向分子。叶酸受体与配体叶酸的结合常数较高($K_d=10^{-10}$ mol/L),且具有较好的可修饰性,可以连接多种治疗药物。构建叶酸修饰的纳米药物/纳米递送系统,可以实现叶酸受体介导的肿瘤靶向给药^[38]。

Ciofani 等^[39]合成了氮化硼纳米管(BNNTs)硼携带剂(图 4)。首先通过包覆聚-L-赖氨酸(PLL)使其表面暴露氨基基团,然后再与叶酸的羧基基团相连接,修饰荧光量子点,最终得到功能化 BNNTs。这种氮化硼纳米管载药系统被证明,能够被多形性胶质母细胞瘤细胞选择性摄取,自身带有的荧光也可在未来 BNCT 治疗实验中,进行体内示踪以配合中子照射。

除了 BNNTs 外,Mandal 等^[40]利用金纳米颗粒,将异硫氰酸荧光素(FITC)标记的 ^{10}B -多聚烯丙胺盐酸盐(^{10}B -FITC-PAH)和硼化聚苯乙烯磺酸钠(^{10}B -PSS)交替包覆在金纳米颗粒表面,形成多层聚电解质外层。为了避免纳米颗粒的聚集,以一层 PSS 和一层 PAH 进行封装,最后利用静电相互作用将叶酸分子修饰在颗粒表面,得到功能化金纳米颗粒载硼系统,这种系统可以被多种

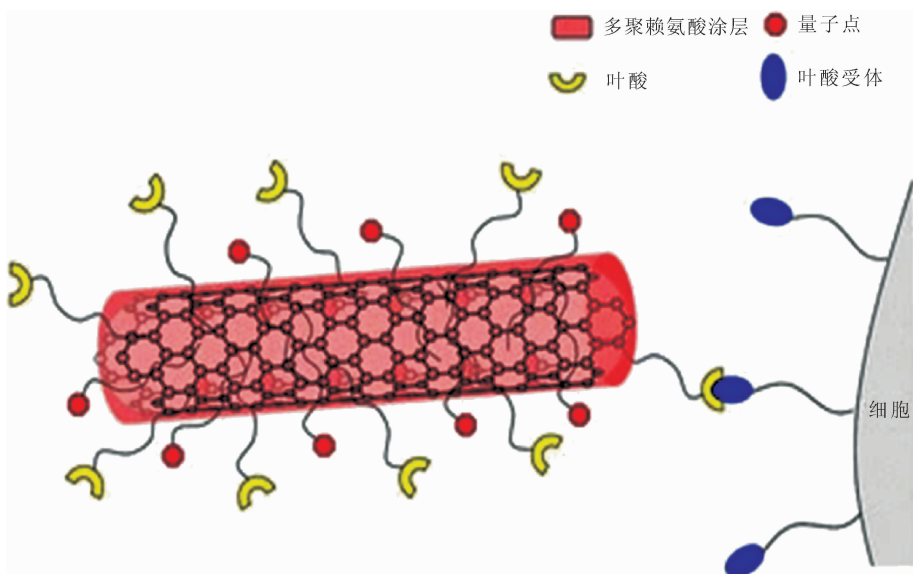
肿瘤细胞摄取。

2) 利用转铁蛋白受体介导靶向肿瘤细胞

转铁蛋白(transferrin, Tf)是一种广泛存在的糖蛋白,能够将血液中的铁通过细胞表面转铁蛋白受体(TfR)转运进入细胞^[41],而 TfR 在恶性细胞中表达上调,且显示出和细胞恶性增殖及肿瘤发生发展具有一定相关性,因此 TfR 成为一种有潜力的肿瘤靶向治疗的靶点^[42]。

文献[43]设计合成了一种包封 BSH 的匀质后的脂质体,活化其表面的羧基后使其和转铁蛋白表面的氨基相连,得到直径小于 200 nm 的纳米硼携带剂,由于其表面的 PEG 基团,延长了该携带剂的血液循环时间,通过转铁蛋白介导的靶向能力,使 ^{10}B 在肿瘤组织富集,注射 3 d 后浓度仍超过 30 ppm,与其他对照组相比,中子照射后荷瘤模型小鼠,明显抑制了肿瘤生长,小鼠生存率显著延长。Doi 等^[44]同样也合成了类似的含硼脂质体,脑胶质瘤小鼠模型静脉注射 24 h 后,肿瘤组织中的硼浓度达到了 20 ppm,中子照射后也显著延长了小鼠的生存率。这些结果表明,靶向 TfR 的含 ^{10}B 脂质体可以提高肿瘤组织中的硼蓄积,有望进一步应用于 BNCT 提高疗效。

在 BNNTs 修饰叶酸配体的研究的基础上,Ciofani 团队^[45]也尝试依赖转铁蛋白靶向给药的策略。他们首先在硝酸的强氧化作用下,在 BNNTs 表面引入羟基,通过硅烷化使 BNNTs 表面携带



叶酸作为配体修饰氮化硼纳米管,靶向肿瘤细胞表面叶酸受体,完成硼药的肿瘤靶向递送^[39]

图 4 叶酸修饰纳米颗粒作为靶向策略^[39]

Fig. 4 Functionalization with folic acid for nanoparticles as targeting strategy^[39]

氨基,和转铁蛋白相连,得到主动靶向的 BNNTs 硼递送系统,体外实验结果显示了肿瘤细胞对这种 BNNTs 的高摄取,说明转铁蛋白的修饰赋予了硼递送系统肿瘤特异性靶向能力。

3) 利用表皮生长因子受体介导靶向肿瘤细胞 表皮生长因子(EGF)受体 EGFR 是一种存在于细胞表面,在多种肿瘤细胞表面过表达或突变后发生超活化的蛋白,因此 EGFR 已经成为一种重要的肿瘤治疗及药物递送靶点^[46]。

为了硼药的肿瘤靶向递送,Kullberg 团队^[47] 尝试利用 EGF 作为靶向分子,他们首先利用 EGF 末端的氨基,在 Traut's 试剂(2-iminothiolane)的存在下,连接一个硫醇基团,后者可以和马来酰亚胺-PEG-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(DSPE)相连,使得 EGF 桥连在一个脂质分子上,脂质分子通过干燥和水化过程形成胶束后,和载带了硼药的脂质体混合得到具有 EGF 靶向配体修饰的载硼脂质体,成为具有有效肿瘤靶向性的纳米硼药(图 5)。

4) 利用单克隆抗体介导靶向肿瘤细胞 单克隆抗体(单抗)是指与特异抗原或表位具有高特异性(单特异性)结合能力的免疫球蛋白^[48]。经过数十年研究,单抗已在临床诊断、治疗包括癌症、感染类疾病、免疫调节等方面得到了广泛应用^[49]。在肿瘤治疗中,单抗除了直接用于干扰肿瘤细胞生长、破坏细胞膜、阻断免疫抑制通路,还作为靶向分子,修饰载体完成放疗或化疗药物的肿瘤靶向递送。

(1) 癌胚抗原(CEA)

癌胚抗原(CEA)是一种组织特异性蛋白,在多种肿瘤细胞中过表达,并分布于细胞膜表面。针对 CEA⁺ 的肿瘤研究表明,CEA 体外致敏 T 细

胞能够在体内产生 CEA 特异性免疫应答,从而杀死肿瘤细胞,是一种非常有前途的肿瘤免疫治疗靶点^[50]。

以 CEA 为配体,构建 BNCT 硼药靶向给药系统。Yanagie 团队^[51] 首先由卵磷脂、胆固醇和 3-(2-吡啶二硫)丙酰基-二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺(DTP-DPPE)混合制备了多腔室脂质体,在水化步骤中引入¹⁰B 化合物(Cs₂¹⁰B₁₂H₁₁SH),得到表面有巯基的含硼脂质体,再在交联剂作用下与 CEA 单抗交联,得到能够靶向肿瘤组织的含硼脂质体。体外实验也显示了其具有肿瘤细胞靶向硼递送能力。

(2) 表皮生长因子受体(EGFR)

同前所述,EGFR 蛋白在肿瘤细胞表面过表达,也可用作肿瘤特异性靶向递送的靶点。Pan 等^[52] 利用特异性结合 EGFR 的西妥昔单抗,将其巯醇化后连接在由马来酰亚胺-PEG-胆固醇分子形成的胶束表面,再与载硼脂质体相混合,得到靶向富硼免疫脂质体。体外实验结果显示出其具有了更高的被肿瘤细胞摄取的能力,可能成为一种潜在的有效硼递送载体。

(3) 人表皮生长因子受体(HER2)

与 EGFR 类似,HER2 也是一种生长因子受体跨膜蛋白,在恶性乳腺细胞中过表达,且可能导致预后不良。过表达的 HER2 也可以作为肿瘤治疗靶点之一,已经有研究显示人源化抗 HER2 单抗治疗和化疗结合能够有效提高生存率^[53]。尝试将 HER2 单抗用于 BNCT 硼携带剂的构建,可能成为一种极具潜力的 BNCT 硼药靶向递送策略。

Wu 等^[54] 设计了功能化金纳米颗粒,利用巯基和金纳米颗粒的相互作用,将巯基化的硼烷和巯基修饰的 HER2 的单抗(61 IgG)同时沉积在

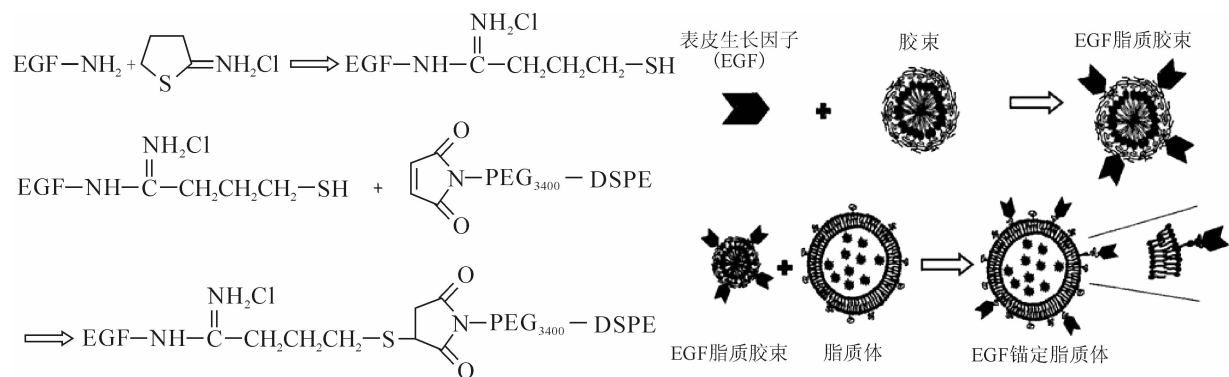


图 5 通过将 EGF 修饰和胶束与载硼脂质体混合,得到具有靶向肿瘤细胞表面 EGFR 能力的含硼脂质体^[47]

Fig. 5 Boron-loading liposomes, obtained via hybridizing EGF-conjugated micelles with boron-containing liposomes, targeting EGFR on tumor cell surface^[47]

金纳米颗粒表面。在体外实验中,这些功能化金纳米颗粒与无修饰的金纳米颗粒相比,显著提高了被肿瘤细胞摄取的能力。为实现体内示踪,研究者利用加成点击反应,将¹²³I标记在金纳米颗粒表面,在 MicroSPECT/CT 成像中显示了优异的体内肿瘤组织的靶向成像。

5) 利用去唾液酸糖蛋白受体介导靶向肿瘤细胞

去唾液酸糖蛋白受体(ASGP-R)表达于肝癌细胞表面,而在正常肝细胞表面极少存在。ASGP-R对半乳糖等碳水化合物表现了较高的亲和力,且能够通过网格蛋白介导内吞,进入肿瘤细胞。以ASGP-R为靶点的纳米载体已经成为一种肝肿瘤靶向给药策略^[55]。Zhang等^[55]设计构建了一种表面修饰壳聚糖-乳糖酸-硫辛酸的中空介孔二氧化硅的复合纳米材料,在酸性条件下,表面壳聚糖质子化,介孔硅负载碳硼烷,当环境溶液pH为中性时,壳聚糖去质子化,防止碳硼烷的泄露,表面修饰的乳糖酸使纳米颗粒通过ASGP-R主动靶向至肝癌细胞,在肿瘤细胞中较高的谷胱甘肽(GSH)和较低的pH双重作用下,刺激释放碳硼烷,后者吸收中子射线后破坏肿瘤细胞DNA,诱导肿瘤细胞凋亡,硫辛酸的释放还减轻了BNCT产生的炎症反应及ROS损伤,最终达到肿瘤治疗并降低副作用的效果。

6) 利用唾液酸(SA)介导靶向肿瘤细胞

肿瘤细胞在发生发展过程中,细胞表面糖基化关键改变之一是唾液酸显著上调,能够直接影响免疫细胞及其与肿瘤细胞的相互作用,也影响肿瘤细胞的迁移和转移能力^[56]。文献^[57]利用PBA与唾液酸的特异性结合能力,设计了一种苯硼酸-PEG-聚乳酸的嵌段共聚物分子,自组装形成100 nm的聚合物纳米颗粒(Nano^{PBA}),相较于临床硼携带剂BPA,依赖于氨基酸浓度梯度的双向转运,Nano^{PBA}基于SA主动运输,在体外实验中展现出了较高的肿瘤细胞摄取能力,尽管由于该纳米颗粒的稳定性欠佳,导致给药后肿瘤组织硼蓄积量只有约1 ppm,但在中子照射后仍表现出了显著的肿瘤抑制作用,这可能由于Nano^{PBA}的细胞内定位更靠近细胞核,提高了肿瘤细胞的DNA断裂率。

3.3 肿瘤细胞核的主动靶向

由于BNCT对肿瘤细胞的杀伤是基于在细胞内的¹⁰B吸收中子后产生的 α 粒子和⁷Li核,因

此细胞内的¹⁰B原子的分布离细胞核越近,越容易对核DNA造成损伤,从而更高效地杀死肿瘤细胞。

为了提高硼药分布的细胞核趋向性,Chen等^[58]巧妙地将阿霉素(DOX)与碳硼烷(CB)结合,并将其插入表面修饰有iRGD的阳离子脂质体中,同时负载CRISPR-Cas9系统来阻断巨噬细胞介导的CD47-SIRP α 免疫监视通路(图6)。实验结果显示,这种脂质体利用环状多肽iRGD完成了肿瘤细胞的靶向递送,进入细胞后,载药系统利用DOX的核易位性,将¹⁰B定位于细胞核,实现了更有效肿瘤细胞杀伤,同时内部包载的质粒激活了肿瘤免疫,进一步阻止了肿瘤复发,提高了小鼠的存活率,这种复合脂质体不仅实现了BNCT硼携带剂靶向递送,同时开拓了联合免疫治疗的新的肿瘤BNCT治疗策略。

4 总结与展望

BNCT是依赖于肿瘤细胞靶向硼药的精准二元治疗方式。设计构建新型硼药的靶向递送系统,是目前BNCT硼药研发中的焦点。为此,硼药递送肿瘤靶点的选择和靶向分子的设计成为了BNCT硼药研发的焦点。

利用组学等方法识别和筛选出更多的肿瘤候选靶点,通过机器学习等手段优化出识别这些靶点的靶向分子库是目前药物研发的一个重要手段。比如,来自苏黎世联邦理工学院的研究人员^[59]通过机器学习方法去优化治疗性抗体,从Herceptin抗体的DNA序列出发,通过CRISPR-Cas9介导的同源定向修复,定点突变产生了约40 000个相关抗体,利用支持这一优化阶段的机器学习方法,优化出最佳的55个序列,可以在实验室中产生抗体并表征其特性。在确定这些靶向分子后,建立模块化的靶向硼药构筑系统是提高当前硼药研发速度的一个重要突破口。这需要首先构建出模块化的硼核,然后将其与靶向分子偶联,从而构建新型靶向硼药筛选库,提高靶向硼药设计和筛选的效率,降低开发成本,促进BNCT硼药的快速发展。

分子靶向药物是继抗体靶向药物之后肿瘤精准治疗的重要发展方向之一。BPA等硼氨酸以及硼苷酸等核酸类似物均具有明显分子靶向特征,已成为小分子硼药研发的焦点。然而这些小分子硼药受限于硼含量、内化和外排等在肿

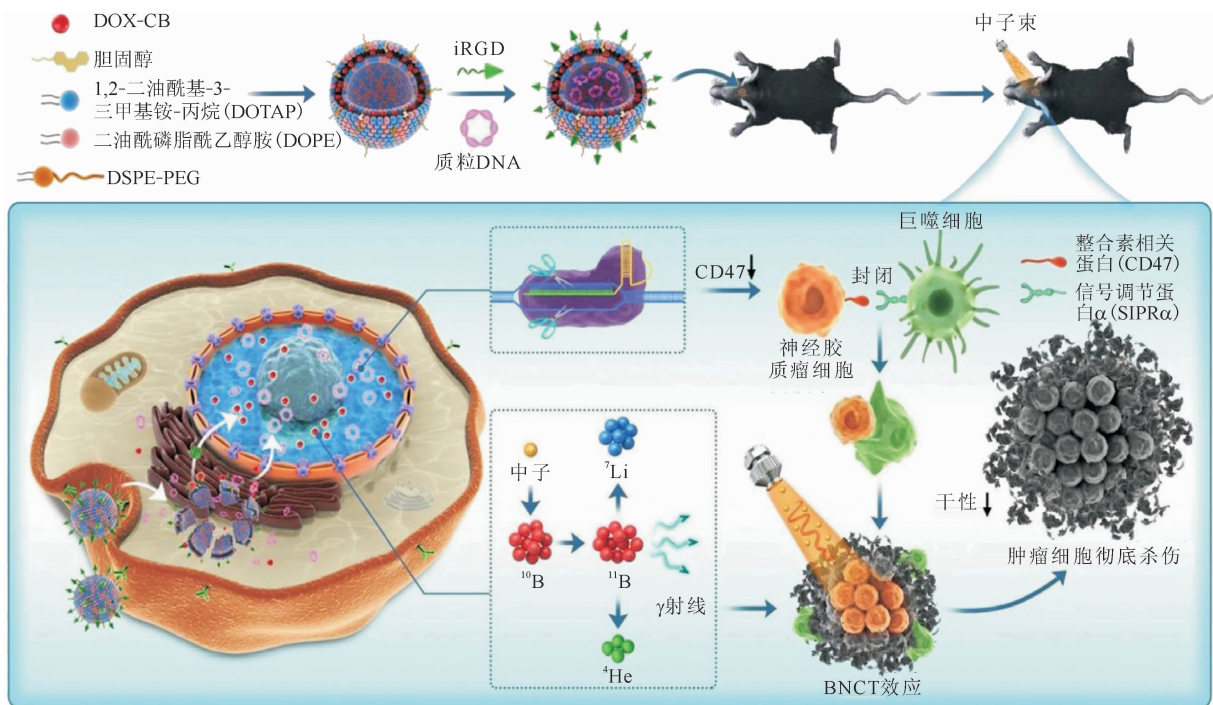


图6 DOX-CB 利用其疏水性插入脂质体膜上,内部包载 CD47-SIRP α 的 CRISPR-Cas9 系统,得到的复合型脂质体将 BNCT 和免疫治疗相结合,达到治疗肿瘤的目的^[58]

Fig. 6 DOX-CB inserts into membranes of liposomes which contain CD47-SIRP α CRISPR-Cas9 system. The multifunctional liposomes combine BNCT with immunotherapy for cancer treatment^[58]

瘤细胞内蓄积和代谢过程等因素的影响,需要在提高硼含量、改善在肿瘤细胞中的代谢、提高在肿瘤细胞内的靶向蓄积等进行进一步的开拓性研究。

多靶向基团的设计可能是硼药研发的新思路。本课题组前期通过水热法将葡萄糖和 BPA 缀合,合成出了一种含硼量子点(BCDs)。这一结构同时拥有葡萄糖和 BPA 的靶向特征,能够通过 LAT1 和葡萄糖转运子双重作用增加脑胶质瘤 U87MG 细胞的硼摄取^[60]。这一结果提示了复合靶向硼药设计的可行性,对小分子硼药和纳米硼携带剂靶向性设计均有一定的借鉴作用。

参考文献:

[1] Quon H, Kiess A P, Chung C H, et al. Salivary gland malignancies[M]//Gunderson L L, Tepper J E. Clinical radiation oncology. Fourth Edition, Elsevier; Philadelphia, 2016: 698-714.
 [2] Hosmane N S, Maguire J A, Zhu Y, et al. Boron and gadolinium neutron capture therapy for cancer treatment[M]. Singapore: World Scientific, 2011: 272.
 [3] Behr T M, Béhé M, Stabin M G, et al. High-linear

energy transfer (LET) alpha versus low-LET beta emitters in radioimmunotherapy of solid tumors: therapeutic efficacy and dose-limiting toxicity of ²¹³Bi- versus ⁹⁰Y-labeled CO17-1A Fab' fragments in a human colonic cancer model[J]. Cancer Res, 1999, 59(11): 2635-2643.
 [4] 王森,童永彭. 硼中子俘获治疗的进展及前景[J]. 同位素, 2020, 33(1): 14-26.
 [5] 张书峰,李春娟,宋明哲,等. 用于硼中子俘获疗法治疗束的光子谱仪设计[J]. 同位素, 2021, 34(5): 421-426.
 [6] Barth R F, Soloway A H, Fairchild R G. Boron neutron-capture therapy for cancer[J]. Sci Am, 1990, 263(4): 100.
 [7] Barth R F, Grecula J C. Boron neutron capture therapy at the crossroads: where do we go from here?[J]. Appl Radiat Isot, 2020, 160: 109029.
 [8] Hiratsuka J, Kamitani N, Tanaka R, et al. Boron neutron capture therapy for vulvar melanoma and genital extramammary Paget's disease with curative responses[J]. Cancer Commun(Lond), 2018, 38(1): 38.
 [9] Suzuki M. Boron neutron capture therapy(BNCT): a unique role in radiotherapy with a view to entering

- the accelerator-based BNCT era[J]. *Int J Clin Oncol*, 2020, 25(1): 43-50.
- [10] Sauerwein W A G, Sancey L, Hey-Hawkins E, et al. Theranostics in boron neutron capture therapy[J]. *Life (Basel)*, 2021, 11(4): 330.
- [11] Malouff T D, Seneviratne D S, Ebner D K, et al. Boron neutron capture therapy: a review of clinical applications[J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 601820.
- [12] Hahn W C, Bader J S, Braun T P, et al. An expanded universe of cancer targets[J]. *Cell*, 2021, 184(5): 1142-1155.
- [13] Kanai Y. Amino acid transporter LAT1(SLC7A5) as a molecular target for cancer diagnosis and therapeutics[J]. *Pharmacol Ther*, 2022, 230: 107964.
- [14] Lee Y, Wiriyasermkul P, Jin C, et al. Cryo-EM structure of the human L-type amino acid transporter 1 in complex with glycoprotein CD98hc[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2019, 26(6): 510-517.
- [15] Shelly K, Feakes D A, Hawthorne M F, et al. Model studies directed toward the boron neutron-capture therapy of cancer: boron delivery to murine tumors with liposomes[J]. *Proc Nat Acad Sci U S A*, 1992, 89(19): 9039-9043.
- [16] Coderre J A, Glass J D, Packer S, et al. Experimental boron neutron capture therapy for melanoma: systemic delivery of boron to melanotic and amelanotic melanoma[J]. *Pigment Cell Res*, 1990, 3(6): 310-318.
- [17] Coderre J A, Glass J D, Fairchild R G, et al. Selective delivery of boron by the melanin precursor analogue *p*-boronophenylalanine to tumors other than melanoma[J]. *Cancer Res*, 1990, 50(1): 138-141.
- [18] Coderre J A, Chanana A D, Joel D D, et al. Biodistribution of boronophenylalanine in patients with glioblastoma multiforme: boron concentration correlates with tumor cellularity[J]. *Radiat Res*, 1998, 149(2): 163-170.
- [19] Wittig A, Sauerwein W A, Coderre J A. Mechanisms of transport of *p*-borono-phenylalanine through the cell membrane *in vitro*[J]. *Radiat Res*, 2000, 153(2): 173-180.
- [20] Fukuda H, Honda C, Wadabayashi N, et al. Pharmacokinetics of ^{10}B -*p*-boronophenylalanine in tumours, skin and blood of melanoma patients: a study of boron neutron capture therapy for malignant melanoma[J]. *Melanoma Res*, 1999, 9(1): 75-83.
- [21] Ono K. An analysis of the structure of the compound biological effectiveness factor[J]. *J Radiat Res*, 2016, 57(Suppl 1): i83-i89.
- [22] Nomoto T, Inoue Y, Yao Y, et al. Poly(vinyl alcohol) boosting therapeutic potential of *p*-boronophenylalanine in neutron capture therapy by modulating metabolism[J]. *Sci Adv*, 2020, 6(4): 11.
- [23] Nomoto T, Yao Y, Inoue Y, et al. Fructose-functionalized polymers to enhance therapeutic potential of *p*-boronophenylalanine for neutron capture therapy[J]. *J Control Release*, 2021, 332: 184-193.
- [24] Liu Z, Chen H, Chen K, et al. Boramino acid as a marker for amino acid transporters[J]. *Sci Adv*, 2015, 1(8): doi: 10.1126/sciadv.1500694.
- [25] Li J, Shi Y, Zhang Z, et al. A metabolically stable boron-derived tyrosine serves as a theranostic agent for positron emission tomography guided boron neutron capture therapy[J]. *Bioconj Chem*, 2019, 30(11): 2870-2878.
- [26] Lamba M, Goswami A, Bandyopadhyay A. A periodic development of BPA and BSH based derivatives in boron neutron capture therapy(BNCT)[J]. *Chem Commun*, 2021, 57(7): 827-839.
- [27] Soloway A H, Hatanaka H, Davis M A. Penetration of brain and brain tumor γ : tumor-binding sulfhydryl boron compounds[J]. *J Med Chem*, 1967, 10(4): 714-717.
- [28] Futamura G, Kawabata S, Nonoguchi N, et al. Evaluation of a novel sodium borocaptate-containing unnatural amino acid as a boron delivery agent for neutron capture therapy of the F98 rat glioma[J]. *Radiat Oncol*, 2017, 12(1): 26.
- [29] Michiue H, Sakurai Y, Kondo N, et al. The acceleration of boron neutron capture therapy using multi-linked mercaptoundecahydrododecaborate (BSH) fused cell-penetrating peptide[J]. *Biomater*, 2014, 35(10): 3396-3405.
- [30] Iguchi Y, Michiue H, Kitamatsu M, et al. Tumor-specific delivery of BSH-3R for boron neutron capture therapy and positron emission tomography imaging in a mouse brain tumor model[J]. *Biomater*, 2015, 56: 10-17.
- [31] Shi Y, Li J, Zhang Z, et al. Tracing boron with fluorescence and positron emission tomography imaging of boronated porphyrin nanocomplex for imaging-guided boron neutron capture therapy[J]. *Acs Appl Mater Interf*, 2018, 10(50): 43387-43395.
- [32] Wang Z, Chen Z, Zhang Z, et al. Multifunctional

- high boron content MOFs nano-co-crystals for precise boron neutron capture therapy for brain glioma in situ[J]. *Nano Today*, 2022, 45: 101558.
- [33] Shibata Y, Matsumura A, Yoshida F, et al. Competitive uptake of porphyrin and LDL via the LDL receptor in glioma cell lines: flow cytometric analysis[J]. *Cancer Letters*, 2001, 166(1): 79-87.
- [34] Sumitani S, Oishi M, Yaguchi T, et al. Pharmacokinetics of core-polymerized, boron-conjugated micelles designed for boron neutron capture therapy for cancer[J]. *Biomater*, 2012, 33(13): 3568-3577.
- [35] Islam W, Matsumoto Y, Fang J, et al. Polymer-conjugated glucosamine complexed with boric acid shows tumor-selective accumulation and simultaneous inhibition of glycolysis[J]. *Biomaterials*, 2021, 269: 120631.
- [36] Yu B, Tai H C, Xue W, et al. Receptor-targeted nanocarriers for therapeutic delivery to cancer[J]. *Mol Membr Biol*, 2010, 27(7): 286-298.
- [37] Soloway A H, Tjarks W, Barnum B A, et al. The chemistry of neutron capture therapy[J]. *Chem Rev*, 1998, 98(4): 1515-1562.
- [38] Low P S, Henne W A, Doorneweerd D D. Discovery and development of folic-acid-based receptor targeting for imaging and therapy of cancer and inflammatory diseases[J]. *Acc Chem Res*, 2008, 41(1): 120-129.
- [39] Ciofani G, Raffa V, Menciassi A, et al. Folate functionalized boron nitride nanotubes and their selective uptake by glioblastoma multiforme cells: implications for their use as boron carriers in clinical boron neutron capture therapy[J]. *Nanoscale Res Lett*, 2008, 4(2): 113-121.
- [40] Mandal S, Bakeine G J, Krol S, et al. Design, development and characterization of multi-functionalized gold nanoparticles for biodetection and targeted boron delivery in BNCT applications[J]. *Appl Radiat Isot*, 2011, 69(12): 1692-1697.
- [41] Sherwood R A, Bomford A. CHAPTER 13: assessment of hepatic function and investigation of jaundice[M]//Third Edition, Marshall W J, et al. *Clinical biochemistry: metabolic and clinical aspects*. New York: Churchill Livingstone, 2014: 231-249.
- [42] Jeong S M, Hwang S, Seong R H. Transferrin receptor regulates pancreatic cancer growth by modulating mitochondrial respiration and ROS generation[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 471(3): 373-379.
- [43] Maruyama K, Ishida O, Kasaoka S, et al. Intracellular targeting of sodium mercaptoundecahydrododecaborate(BSH) to solid tumors by transferrin-PEG liposomes, for boron neutron-capture therapy (BNCT)[J]. *J Control Release*, 2004, 98(2): 195-207.
- [44] Doi A, Kawabata S, Lida K, et al. Tumor-specific targeting of sodium borocaptate(BSH) to malignant glioma by transferrin-PEG liposomes: a modality for boron neutron capture therapy[J]. *J Neurooncol*, 2008, 87(3): 287-294.
- [45] Ciofani G, Del Turco S, Genchi G G, et al. Transferrin-conjugated boron nitride nanotubes: protein grafting, characterization, and interaction with human endothelial cells[J]. *Int J Pharm*, 2012, 436(1-2): 444-453.
- [46] Uribe M L, Marrocco I, Yarden Y. EGFR in cancer: signaling mechanisms, drugs, and acquired resistance[J]. *Cancers(Basel)*, 2021, 13(11): 2748.
- [47] Kullberg E B, Bergstrand N, Carlsson J, et al. Development of EGF-conjugated liposomes for targeted delivery of boronated DNA-binding agents[J]. *Bioconjug Chem*, 2002, 13(4): 737-743.
- [48] LiverTox: clinical and research information on drug-induced liver injury: PMID 31643176[EB/OL]. Bethesda(MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2012.
- [49] Waldmann T A. Monoclonal antibodies in diagnosis and therapy[J]. *Science*, 1991, 252(5013): 1657-1662.
- [50] Tsang K Y, Zaremba S, Nieroda C A, et al. Generation of human cytotoxic T cells specific for human carcinoembryonic antigen epitopes from patients immunized with recombinant vaccinia-CEA vaccine[J]. *J Nat Cancer Inst*, 1995, 87(13): 982-990.
- [51] Yanagie H, Tomita T, Kobayashi H, et al. Application of boronated anti-CEA immunoliposome to tumour cell growth inhibition in *in vitro* boron neutron capture therapy model[J]. *Br J Cancer*, 1991, 63(4): 522-526.
- [52] Pan X, Wu G, Yang W, et al. Synthesis of cetuximab-immunoliposomes via a cholesterol-based membrane anchor for targeting of EGFR[J]. *Bioconjug Chem*, 2007, 18(1): 101-108.
- [53] Lohrisch C, Piccart M. An overview of HER2[J].

Seminars in Oncology, 2001, 28: 3-11.

- [54] Wu C Y, Lin J J, Chang W Y, et al. Development of theranostic active-targeting boron-containing gold nanoparticles for boron neutron capture therapy (BNCT)[J]. Colloid Surface B, 2019, 183: 110387.
- [55] Zhang T, Xu D, Yi Y, et al. Chitosan-lactobionic acid-thioctic acid-modified hollow mesoporous silica composite loaded with carborane for boron neutron capture therapy of hepatocellular carcinoma[J]. Mater Des, 2022, 223: 111196.
- [56] Pearce O M, Laubli H. Sialic acids in cancer biology and immunity[J]. Glycobiol, 2016, 26(2): 111-128.
- [57] Kim A, Suzuki M, Matsumoto Y, et al. Non-isotope enriched phenylboronic acid-decorated dual-functional nano-assemblies for an actively targeting BNCT drug[J]. Biomater, 2021, 268: 120551.
- [58] Chen J, Dai Q, Yang Q, et al. Therapeutic nucleus-access BNCT drug combined CD47-targeting gene editing in glioblastoma[J]. J Nanobiotech, 2022, 20(1): 102.
- [59] Mason D M, Friedensohn S, Weber C R, et al. Optimization of therapeutic antibodies by predicting antigen specificity from antibody sequence via deep learning[J]. Nat Biomed Eng, 2021, 5(6): 600-612.
- [60] Li J, Kong J, Ma S, et al. Exosome-coated ^{10}B carbon dots for precise boron neutron capture therapy in a mouse model of glioma in situ[J]. Adv Funct Mater, 2021, 31(n/a): 2100969.