新型蛋白降解靶向嵌合体 LC-2 脂质体的制备和表征

苏林豫[1]，朱效素[1]，张 蓬[1]，刘 沙[1]，孙考祥[1,2]*

（1. 烟台大学药学院，烟台大学新型制剂与生物技术药物研究山东省高校协同创新中心，分子药理和药物评价教育部重点实验室（烟台大学），山东烟台 264005；2. 山东绿叶制药有限公司长效和靶向制剂国家重点实验室，山东烟台 264003）

摘要：本试验设计并制备了一种包封新型蛋白降解靶向嵌合体（PROTAC）LC-2（**1**）的脂质体。以氢化大豆卵磷脂、半琥珀酸胆固醇、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺 - 聚乙二醇 2000 为原料，八聚精氨酸修饰脂质体表面，旨在增加 **1** 的细胞穿透能力，解决递送难题。对制得的脂质体进行表征，并以粒径和包封率为考察指标，通过单因素考察及 Box-Behnken 设计 - 响应面法对处方工艺进行筛选。结果显示，采用改良的乙醇注入法制备脂质体，平均粒径为（117.3±0.6）nm，包封率可达（88.9±0.3）%。体外释放试验结果显示，制品在磷酸盐缓冲液（PBS，pH 7.4）和含 50%胎牛血清的 PBS 中初始阶段释放行为略有不同，但 48 h 累积释放率均为 50%左右，说明脂质体具有一定缓释效果。本试验使用改良的乙醇注入法制得的脂质体包封率较高、粒径适宜、稳定性好，包封率测定方法简单可行、准确度高，可为 PROTAC LC-2 的体内递送研究提供参考。

关键词：蛋白降解靶向嵌合体；响应面法；脂质体；改良的乙醇注入法；包封率；体外释放

中图分类号：R944.9 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-8255（2022）05-0679-09

DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2022.05.013

Preparation and Characterization of Novel Proteolysis Targeting Chimeras LC-2 Liposomes

SU Linyu[1], ZHU Xiaosu[1], ZHANG Peng[1], LIU Sha[1], SUN Kaoxiang[1,2]*

（*1. Key Lab. of Molecular Pharmacology and Drug Evaluation (Yantai University), Ministry of Education, Collaborative Innovation Center of Advanced Drug Delivery System and Biotech Drugs in Universities of Shandong, School of Pharmacy, Yantai University, Yantai 264005; 2. State Key Lab. of Long-Acting and Targeting Drug Delivery System, Shandong Luye Pharmaceutical Co., Ltd., Yantai 264003*）

ABSTRACT: In this paper, proteolysis targeting chimeras (PROTAC) LC-2 (**1**) encapsulated liposomes were designed and studied. The liposomes constructed by hydrogenated soybean phospholipid, cholesteryl hemisuccinate, lipids 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-[methoxy(polyethylene glycol)-2000] were modified by octaarginine to increase the penetration ability of **1**, aiming to solve the delivery dilemma. Several properties of the liposomes were characterized. The formulation and process parameters were optimized by single factor test and Box-Behnken design combined with response surface method with particle size and encapsulation efficiency as the indicators. The results showed that liposomes prepared by the improved ethanol injection method exhibited an average particle size of (117.3±0.6) nm with an encapsulation efficiency of (88.9±0.3)%. *In vitro* release profiles showed that the initial release behaviors were slightly different in phosphate buffer (PBS, pH 7.4) and PBS containing 50% of fetal bovine serum (FBS). However, about 50% of encapsulated agents were released in both media, indicating that the liposomes possessed a sustained-release characterization. Herein, the liposomes prepared by the improved ethanol injection method exhibited high encapsulation efficiency, appropriate particle size and good stability. The method for encapsulation efficiency determination had specific advantages, such as high sensitivity, simple operation, and high accuracy. The study would provide a reference for the study of *in vivo* delivery of PROTAC LC-2.

Key Words: proteolysis targeting chimera; response surface method; liposome; improved ethanol injection method; encapsulation efficiency; *in vitro* release

恶性肿瘤是目前严重威胁人类健康的疾病之一。研究表明 Kirsten 大鼠肉瘤病毒癌基因同源物（Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog，*K-RAS*）是影响细胞增殖分化的重要因素[1]。*K-RAS* 是属于 *RAS* 家族一个原癌基因，该家族还包含 *H-RAS*（*harvey-RAS*）、*N-RAS*（*neuroblastoma-RAS*）等，其突变常见于胰腺癌、肺癌等恶性肿瘤。*K-RAS* 编码的蛋白为一种 GTP 酶，在正常细胞中承担着分子开关的作用，而 *K-RAS* 突变会减弱该蛋白酶的活性，导致结合型积累，过度激活下游信号，从而造成异常的细胞增殖[2]。由于 *K-RAS* 突变蛋白表面缺乏传统意义上可成药口袋，小分子药物无法发挥作用，是世界公认的“不可成药靶点”，因此针对 *K-RAS* 突变患者的靶向药物研究目前仍是一个挑战[3]。近年来蛋白降解靶向嵌合体（proteolysis targeting chimeras，PROTAC）的出现为解决以上问题带来希望。PROTAC 由小分子靶蛋白配体、连接基团和 E3 泛素化酶配体共同组成（结构如图 1 所示）[4—5]，能同时识别目标蛋白和 E3 泛素连接酶，在体内通过泛素 - 蛋白酶体途径引导靶蛋白降解，达到疾病治疗的效果，抗恶性肿瘤效果比直接抑制蛋白好[6—8]。

靶蛋白降解后，PROTAC 又被重新释放，继续参与下一次降解过程。PROTAC 并不依赖占位驱动，且仅需要催化量即可达到效果，具有克服耐药性、提高药物选择性、减轻不良反应及可循环使用等优势[9—10]。作为新药研发的重要方向，PROTAC 已成功应用于多种疾病相关靶点［如雌激素受体（estrogen receptor，ER）[11]、雄激素受体（androgen receptor，AR）[12]、含溴代烷的蛋白 4（bromodomain-containing protein 4，BRD4）］的体内和体外研究[13—15]。作用于 ER 的口服 PROTAC ARV-471 和作用于 AR 的 ARV-110 在临床前研究中均显示出优异的疗效，目前正在进行Ⅰ期临床试验，以评估其安全性和耐受性[16]。研究显示，第一类内源性的 *K-RAS* PROTAC 物质 LC-2（**1**）包含结合 *K-RAS* 突变蛋白的 MRTX 和 E3 连接酶配体 VHL（结构式见图 2），临床前研究表明其可持续降解靶蛋白[17—19]。

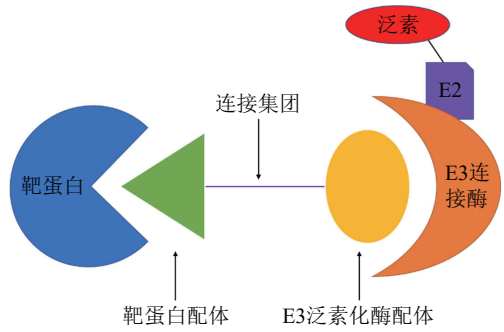


图 1　PROTAC 结构示意图

Fig.1　Schematic Structure of PROTAC

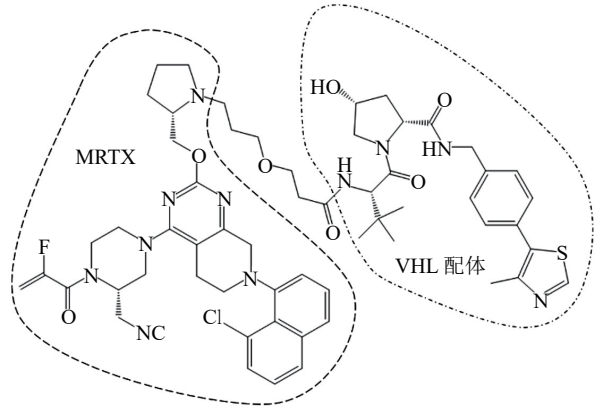


图 2　1 结构式

Fig.2　Structural Formula of **1**

虽有诸多优点，但包括 **1** 在内的 PROTAC 分子普遍具有相对分子质量大、水溶性差和生物利用度低等问题。因此，本试验利用脂质体包封 **1**，并对脂质体进行表面修饰，旨在克服上述问题。脂质体是一种常用的亲脂性载体，工业化技术成熟，

收稿日期：2021-10-28

基金项目：国家自然科学基金项目（82001961）、山东省自然科学基金项目（ZR2016HB58）

作者简介：苏林豫（1996—），女，硕士研究生，专业方向：肿瘤靶向制剂。

通信作者：孙考祥（1964—），男，教授，博士生导师，从事缓控释及纳米靶向等新型药物递送系统研究及开发。

E-mail：sunkx@ytu.edu.cn

具有生物相容性好、毒性低、工艺简单等诸多优点。半琥珀酸胆固醇（cholesteryl hemisuccinate，CHEMS）能够维持脂质体的稳定，调节膜的流动性并减少药物泄漏[20]。二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000[lipids 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-[methoxy(polyethylene glycol)-2000]，DSPE-PEG 2000]是一种常用的功能化PEG衍生化磷脂，能够使脂质体表面形成亲水屏障、降低与血液成分的相互作用、提高生物利用度、延长制剂的血液循环时间、增加制剂稳定性和免疫靶向性[21]。细胞穿透肽八聚精氨酸（cell penetrating peptide R8，R8）是由8个精氨酸构成的穿膜肽，可介导多种物质进入细胞，转导效率高且对细胞的损伤低，研究证明经R8修饰的脂质体能显著提高穿透细胞的能力[22—23]。本试验以**1**为模型药物，设计并制备一种表面修饰R8的脂质体（**1**-LP），并以包封率、粒径为考察指标，利用单因素考察和Box-Behnken设计-响应面法筛选**1**-LP的制备方法和处方工艺；通过体外释放试验考察脂质体的释放行为，为**1**递送系统的开发提供理论依据和试验基础。

1 仪器与试药

RV 3 V型旋转蒸发仪（德国IKA公司）；JY92-Ⅱ型超声波细胞粉碎机（宁波新芝生物科技股份有限公司）；ME-T型电子分析天平（美国Mettler Toledo国际有限公司）；Nicomp 380 ZLS型激光粒度仪（美国PSS公司）；JEM-1230型透射电镜（日本JEOL公司）；UV-2450型紫外分光光度仪（日本Shimadzu公司）；LF-1型挤出器（美国Avestin公司，膜径100 nm）。

1（上海瀚香生物科技有限公司，纯度>98%，批号20210302）；氢化大豆卵磷脂（hydrogenated soybean phospholipids，HSPC，**2**，上海艾韦特医药科技有限公司，纯度>90%，批号B60455）；CHEMS（美国Sigma公司，**3**，纯度>99%，批号023J5431）；DSPE-PEG 2000（**4**，上海芃硕生物科技有限公司，纯度>95%，批号F06019）；DSPE-PEG 2000-R8（**5**，西安瑞禧生物科技有限公司，纯度>95%，批号RJ0211615）；胎牛血清（fetal bovine serum，FBS，美国Gibco公司）；磷酸盐缓冲液（PBS，美国HyClone公司，浓度0.01 mol/L，pH 7.4）；无水乙醇、三氯甲烷、甲醇、磷钨酸溶液均为分析纯。

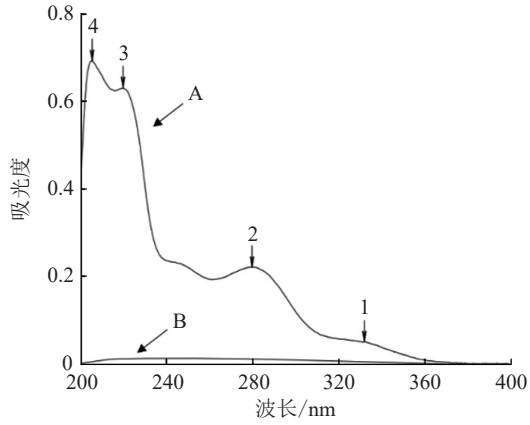
2 方法与结果

2.1 含量测定方法

2.1.1 检测波长

取适量的**1**与相应量的空白脂质体，配制二者的甲醇溶液。用紫外分光光度计在200～400 nm范围内扫描，确定**1**的检测波长。

结果如图3所示，**1**在峰2处（280 nm）和峰3处（220 nm）皆有吸收，但峰3处于近紫外端，偏差较大，峰2处未见空白脂质体干扰，所以选择280 nm作为**1**的检测波长。



A：**1**，B：空白脂质体

图3 紫外吸收图谱

Fig.3 Ultraviolet Absorption Spectrum

2.1.2 线性试验和方法学验证结果

配制质量浓度（*c*）为2.5、5、10、15、20和25 μg/ml的一系列**1**甲醇溶液，在280 nm波长处测定吸光度（*D*），以*D*为纵坐标、*c*为横坐标，绘制标准曲线，所得标准曲线方程为D=0.013 6c+0.000 7，R^2=0.999 7，表明**1**甲醇溶液在2.5～25 μg/ml线性关系良好。计算得低、中、高浓度（5、10和15 μg/ml）的**1**甲醇溶液日内RSD分别为0.15%、0.13%和0.10%（n=5），日间RSD分别为0.15%、0.10%和0.10%（n=5），可见本法精密度良好。回收率分别为100.52%、100.64%、100.77%，RSD分别为0.16%、0.08%和0.09%（n=5），提示本法

的回收率良好。重现性试验结果表明，**1** 质量浓度的 RSD 为 0.16%，小于 1%，提示本法重现性良好。

2.2　制备方法及表征

2.2.1　制备方法

分别采用 3 种方法制备 **1**-LP，所得制品结构示意图见图 4。以包封率和粒径为评价指标筛选最佳制备方法。

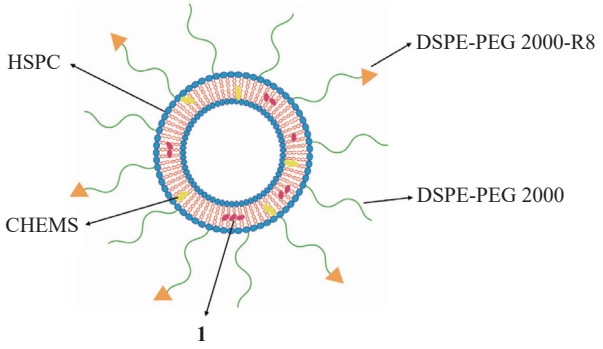


图 4　1-LP 结构示意图

Fig.4　Structural Schematic Diagram of **1**-LP

改良的乙醇注入法 [24]：取 **1**、**2**、**3**、**4**、**5** 按摩尔比 1 ∶ 24 ∶ 13 ∶ 2 ∶ 0.7 溶于无水乙醇，将溶液转移至圆底烧瓶中，置 45 ℃水浴中加热挥除无水乙醇，成膜后匀速注入相同温度的 PBS 4 ml，水合 20 min，将制得的 **1**-LP 进行超声（120 W，6 min），重复 2 次，过 0.22 μm 微孔滤膜后纯化，即得。

薄膜分散 - 超声法：取 **1**、**2**、**3**、**4**、**5** 按上述比例溶于氯仿，旋蒸除掉有机溶剂，形成薄膜后注入相同温度的 PBS 4 ml，于 45 ℃下水合 20 min，将制得的 **1**-LP 进行超声过膜，条件同上，即得。

薄膜分散 - 挤出器法：同“薄膜分散 - 超声法”制备方法制得水合液，通过挤出器挤压，过膜条件同上，即得。

2.2.2　包封率和粒径的测定

取纯化后的 **1**-LP 100 μl，用甲醇破乳并定容至 5 ml，测定吸光度，记为 D_0。取未纯化的 **1**-LP 100 μl 同法用甲醇破乳，定容至 5 ml，测定吸光度，记为 D_1。根据标准曲线计算 **1** 质量浓度和包封率。

取 **1**-LP 100 μl 用蒸馏水稀释后置比色皿中，采用激光粒度仪测量粒径。工作参数：采用水相，检测时间 2 min，循环次数 3 次。

照“**2.2.1**”项下 3 种方法制备的 **1**-LP 的包封率分别为 (81.0±1.1) %、(57.3±1.4) %、(53.2±2.0) %，粒径分别为 (116.1±1.2)、(138.0±1.8)、(105.8±1.4) nm，其中采用改良的乙醇注入法制备的 **1**-LP 粒径适宜、包封率较高，故以下试验中的 **1**-LP 均采用该法制备。

2.3　单因素法优化

采用单因素法，以包封率和粒径为主要评价指标，对 **2** 与 **3** 的摩尔比（n_2 ∶ n_3）、**2** 与 **1** 的摩尔比（n_2 ∶ n_1）、**2** 与 **5** 的摩尔比（n_2 ∶ n_5）、孵育温度以及孵育时间进行考察，非考察因素设置参照“**2.2.1**”项下的用量。

结果如表 1 所示，可见包封率随 n_2 ∶ n_3、n_2 ∶ n_5、孵育温度、孵育时间的变化呈上升达到峰值后下降的趋势，随 n_2 ∶ n_1 升高则呈逐渐降低的趋势；粒径随 n_2 ∶ n_3、n_2 ∶ n_1、n_2 ∶ n_5 的升高呈增大趋势，随孵育温度、孵育时间的变化则出现下降达谷值后逐渐增加的趋势。

表 1　关键因素对脂质体包封率和粒径的影响（n=3）

Tab.1　Influences of Critical Factors on Encapsulation Efficiency and Particle Size of the Liposomes（n=3）

关键因素	变量	包封率/%	粒径/nm
n_2 ∶ n_3	0.9 ∶ 1	72.4±1.6	108.6±0.5
	1.8 ∶ 1	80.3±0.8	115.2±0.8
	2.7 ∶ 1	68.3±0.9	120.8±0.4
n_2 ∶ n_1	21 ∶ 1	85.1±1.0	112.2±1.2
	42 ∶ 1	66.9±0.7	121.4±0.7
	63 ∶ 1	52.4±0.9	130.6±0.9
n_2 ∶ n_5	53 ∶ 1	62.5±0.9	113.3±0.5
	81 ∶ 1	79.4±0.9	123.2±1.2
	162 ∶ 1	55.8±0.4	130.2±1.5
孵育温度/℃	40	67.5±0.7	125.2±1.3
	45	78.5±0.9	117.2±1.5
	50	61.7±1.0	129.4±0.6
孵育时间/min	15	63.4±0.9	127.0±0.9
	20	77.2±0.7	117.6±0.9
	25	57.9±1.2	135.2±1.7

2.4　Box-Behnken 设计 - 响应面法优化

2.4.1　考察因素和水平

根据前期考察结果，选取 n_2 ∶ n_1(A)、

n_2 ∶ n_5(*B*)、孵育温度（*C*）、孵育时间（*D*）为考察因素，以粒径（Y_1）、包封率（Y_2）为响应值，采用 Box-Behnken 设计 - 响应面法进行处方优化。各因素水平见表 2。

表 2 Box-Behnken 设计因素水平表

Tab.2 Factors and Levels of Box-Behnken Design

因素	水平		
	－1	0	1
A	21	42	63
B	53	107.5	162
C/℃	40	45	50
D/min	15	20	25

2.4.2 响应面法分析

使用 Design-Expert 8.0.6 软件对试验结果进行拟合分析，所得拟合方程如下。

Y_1=121.14+9.21*A*+3.21*B*+0.53*C*+1.11*D*+1.50*AB* − 1.98*AD*+1.53*BC* − 1.40*BD* − 2.8*CD*+1.27A^2+2.94B^2+7.94C^2+7.97D^2，*r*=0.797 1，*P*<0.000 5

Y_2=74.05 − 18.03*A* − 1.91*B*+3.03*C* − 1.69*D* − 0.55*AB* − 0.71*AC* − 1.79*AD* − 0.78*BC* − 4.65*BD* − 1.82*CD*+4.61A^2 − 15.37B^2 − 23.43C^2 − 17.13D^2，*r*=0.959 6，*P*<0.000 1

方差分析结果证明，上述 2 个模型的拟合效果均为显著（*P*<0.05），失拟项均为不显著。在 Y_1 响应面中，因素 *A*、*B*、C^2、D^2 影响显著；在 Y_2 响应面中，因素 *A*、*C*、*BD*、A^2、B^2、C^2、D^2 影响显著。相应响应面如图 5、图 6 所示。

由图 5、6 可知，粒径随 *A* 与 *B* 增大逐渐增加，随 *C*、*D* 增加则表现为降至谷值后逐渐升高；包封率随 *A* 的增大逐渐降低，随 *B*、*C*、*D* 增加则出现升至峰值后逐渐降低的趋势。

2.4.3 优化处方工艺及验证

通过 Design-Expert 8.0.6 软件预测得到的最佳处方为 *A*=21.81，*B*=72.78，*C*=45.4 ℃，*D*=21.3 min，预测制品的粒径为 115.0 nm，包封率为 90.1%。对最优处方工艺稍作调整，最终处方工艺如下：取 **1**、**2**、**3**、**4**、**5** 按摩尔比 1 ∶ 22 ∶ 12 ∶ 2 ∶ 0.3 溶于无水乙醇，将溶液转移至圆底烧瓶中，置 45 ℃水浴中加热，挥除无水乙醇，成膜后匀速注入相同温度的 PBS 4 ml，水合 20 min，将制得的 **1**-LP 进行超声过膜，即得。

照上述最终处方制备 3 批 **1**-LP（处方量为 4 ml），测得粒径和包封率均值为（117.3±0.6）nm 和（88.9±0.3）%，实测值与预测值的偏差为 2.0% 和 1.3%，证明建立的模型可用于处方优化。

2.5 脂质体的表征

2.5.1 载药量的测定

照“**2.2.2**”项下方法测定包封率，根据测得的质量浓度，得到 **1**-LP 内 **1** 的量并计算载药量（DL）。

$DL=W_e/W_m\times100\%$

式中，W_e 表示包封的药量；W_m 表示载药脂质体的总质量。

结果显示，照最佳工艺制得的 **1**-LP 的载药量为（3.8±1.6）%（*n*=3），可以满足要求。

2.5.2 形态、粒径及 ζ 电位的测定

取一枚普通碳支持膜，将制备好的 **1**-LP 5 μl 滴在表面，自然干燥 5 min 后，将剩余的 **1**-LP 吸走，吸取磷钨酸溶液 5 μl 滴在表面，自然干燥 5 min 后，将剩余的染料吸走，即得样品。将样品置透射电镜下观察，观察 **1**-LP 的形态结构。

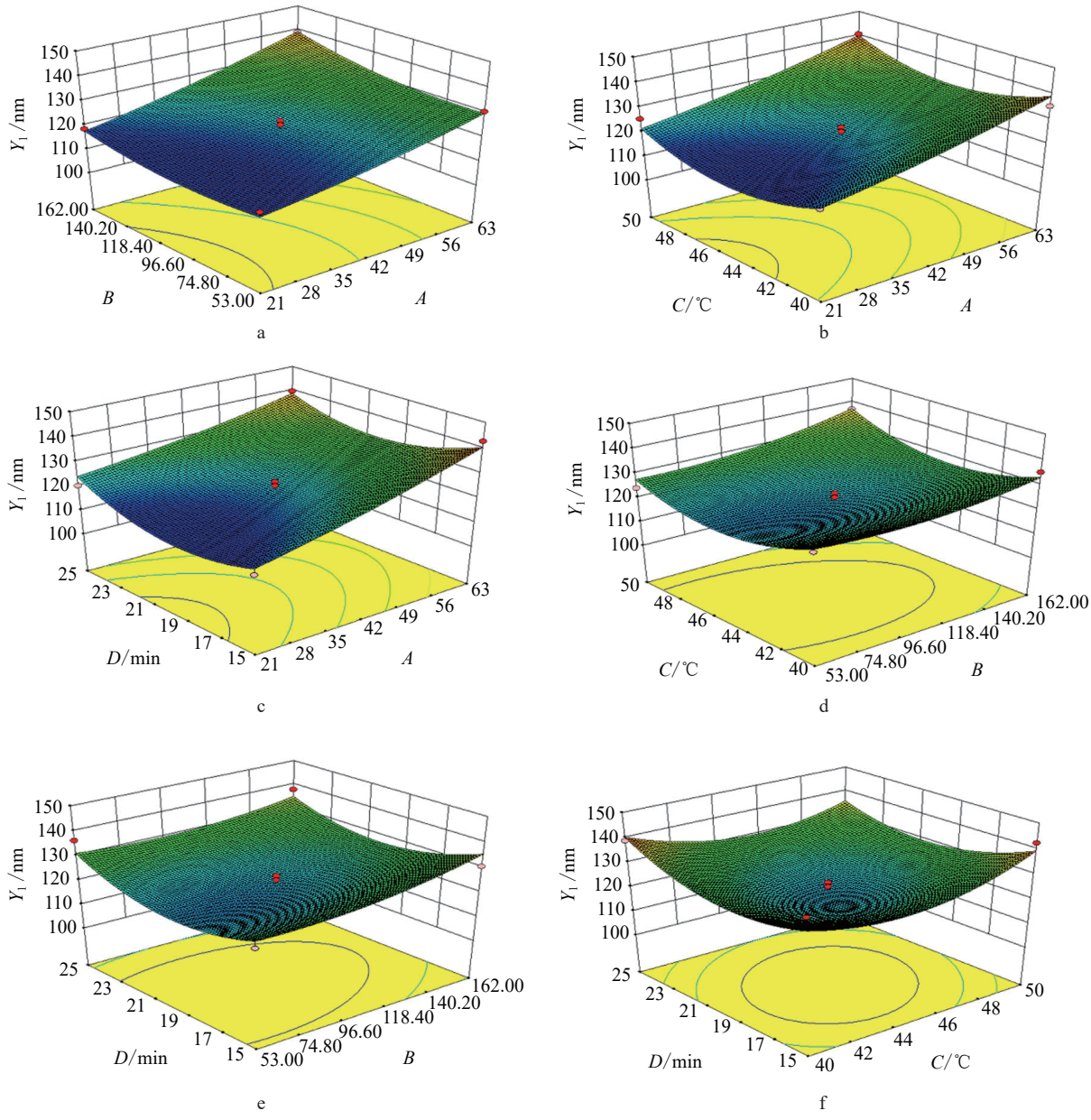
透射电镜结果如图 7 所示，脂质体形态较为完整，呈球形，符合脂质体的形态学特征。

照“**2.2.2**”项下方法测定脂质体的粒径。取 **1**-LP 100 μl 并用去离子水稀释，置比色皿中，采用激光粒度仪测量 ζ 电位，测量温度为 25 ℃，样品 pH 7.3。

测得 **1**-LP 的平均粒径为（117.3±0.6）nm（*n*=3），ζ 电位为（－8.3±1.9）mV（*n*=3），粒度和 ζ 电位分布如图 8 所示。所得的 **1**-LP 略带负电，多分散性指数为 0.133±0.034（*n*=3）。

2.5.3 体外释放试验

取纯化后的 **1**-LP 1 ml 置透析袋（截留分子量 10 000）内，放入分别装有 PBS 或含 50% FBS 的 PBS 25 ml 的离心管中，采用水浴恒温振荡法，摇床的条件设置为 100 r/min，温度为 37 ℃。分别于 0.08、0.5、1、2、4、8、24、48 h 时取释放介质 1 ml（立即补充同温等量新鲜的相应释放介质），采用



a：因素 *A* 及 *B* 对 Y_1 的影响，b：因素 *A* 及 *C* 对 Y_1 的影响，c：因素 *A* 及 *D* 对 Y_1 的影响，d：因素 *B* 及 *C* 对 Y_1 的影响，e：因素 *B* 及 *D* 对 Y_1 的影响，f：因素 *C* 及 *D* 对 Y_1 的影响

图 5　Y_1 的 3D 响应面图

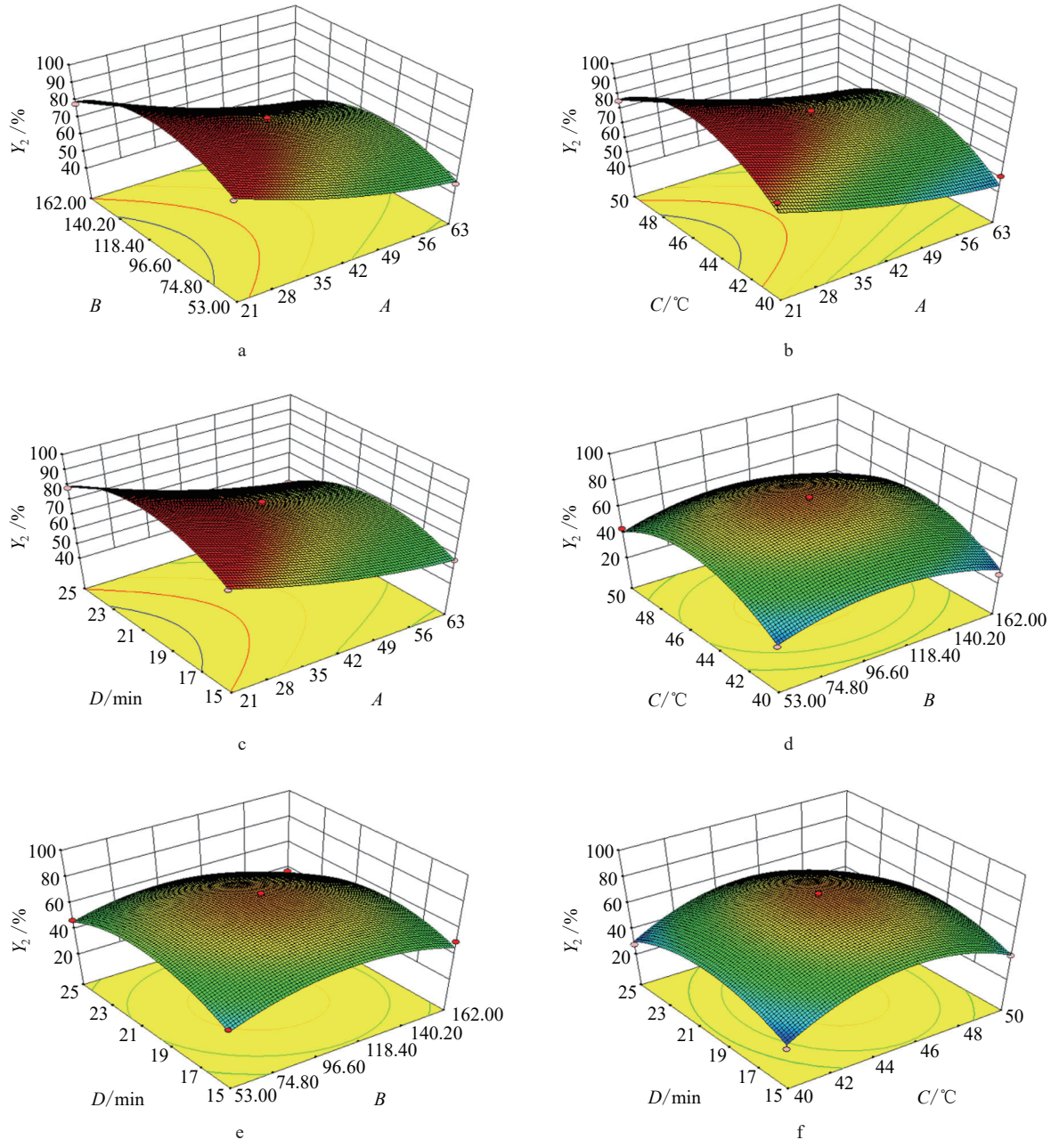
Fig.5　3D Response Surface Plots of Y_1

紫外分光光度法测量并计算累积释放率（*Q*）。

释放曲线如图 9 所示。**1**-LP 在 PBS 和含 50% FBS 的 PBS 中的释放曲线形态相类似，但在含 50% FBS 的 PBS 中 **1**-LP 在初始阶段的释放速率较大；2 种介质中的最终释放总量相当，均可在 48 h 释放 50%左右。

3　讨论

PROTAC 是一种应用前景广阔的新型化合物，但存在水溶性差、透膜率低等缺点。脂质体作为一种常用的纳米载体，表面修饰后可有效解决上述问题。常用的脂质体制备方法包括薄膜分散法、过膜挤压法、注入法、逆相蒸发法、化学梯度法等。因



a：因素 *A* 及 *B* 对 Y_2 的影响，b：因素 *A* 及 *C* 对 Y_2 的影响，c：因素 *A* 及 *D* 对 Y_2 的影响，d：因素 *B* 及 *C* 对 Y_2 的影响，e：因素 *B* 及 *D* 对 Y_2 的影响，f：因素 *C* 及 *D* 对 Y_2 的影响

图 6 Y_2 的 3D 响应面图

Fig.6 3D Response Surface Plots of Y_2

模型药物为脂溶性，本试验采用薄膜分散 - 超声法、薄膜分散 - 挤出器法、改良的乙醇注入法制备脂质体，结果证明 3 种方法均可成功制备 **1**-LP。与另 2 种方法相比，改良的乙醇注入法使用的乙醇毒性低，全程操作方便，制备时间显著缩短，制备的 **1**-LP 外观较为清澈，呈透明的蓝色乳光且包封率较高。综上所述，选用改良的乙醇注入法作为 **1**-LP 的制备方法。

常用的脂质体包封率测定方法包括超滤离心法、凝胶过滤法、透析法、滤膜法等。超滤离心法

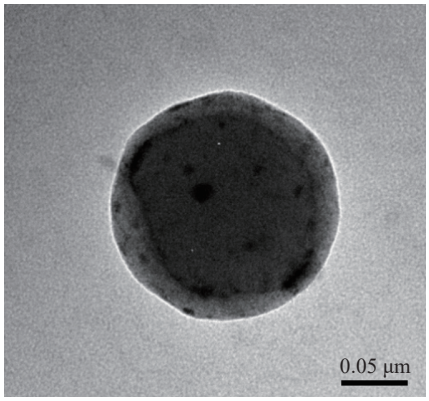


图 7　1-LP 的透射电镜照片（×80 000）
Fig.7　Transmission Electron Micrograph of **1**-LP (×80 000)

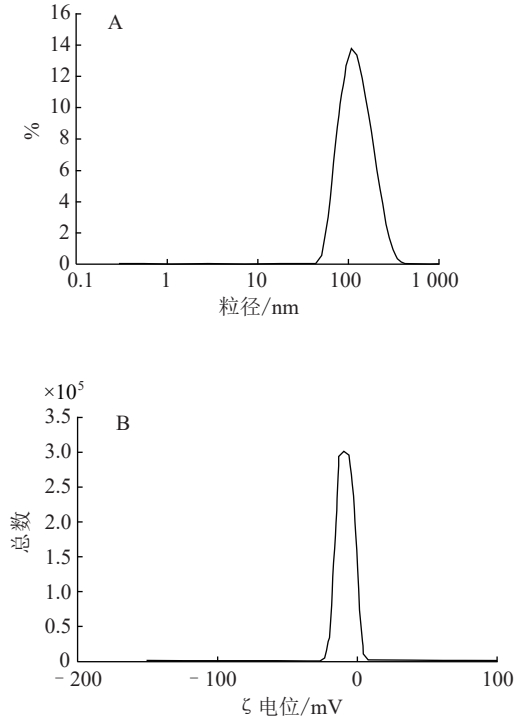


图 8　1-LP 的粒径（A）和 ζ 电位（B）分布图
Fig.8　Particle Size (A) and ζ Potential (B) Distributions of **1**-LP

对设备要求较高，凝胶过滤法和透析法耗费时间较长、操作复杂。本试验中的模型药物水溶性差，而滤膜法操作简单，试验成本低且结果准确，较适于分离游离 **1** 与 **1**-LP。

单因素试验中，所有因素对 **1**-LP 粒径变化均不显著；改变 **2** 与 **3** 比例，**1**-LP 包封率变化相对较小，

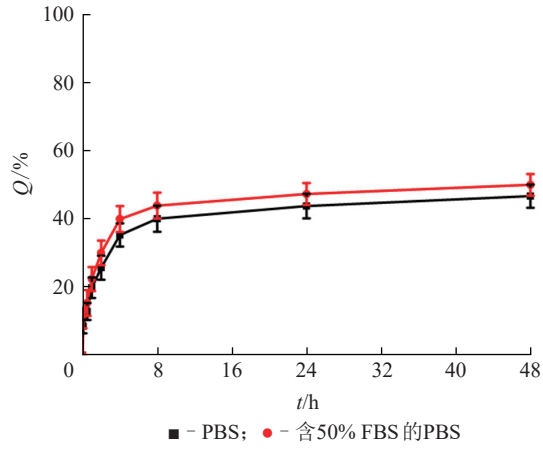


图 9　1-LP 在不同介质中的体外释放曲线（*n*=3）
Fig.9　*In vitro* Release Curves of **1**-LP in Different Media (*n*=3)

结果均在 65% 以上；改变 **2** 与 **1** 比例，包封率变化明显，随投药量增加包封率逐渐升高；改变 **2** 与 **5** 的比例，包封率存在显著差别，可能与使用材料的结构相关；改变孵育温度和孵育时间，包封率随温度升高而增大到峰值，随后逐渐降低。通过单因素考察筛选出对处方工艺影响较为重要的因素后，再采用 Box-Behnken 设计 - 响应面法进行优化，最终确定了 **1**-LP 的最佳处方，照最佳处方制备的 **1**-LP 包封率较高、粒径适宜，外观形态呈略带蓝色乳光的半透明溶液。

体外释放试验是考察脂质体释放特性的重要方法。本试验结果证明 **1**-LP 在 PBS 和含 50% FBS 的 PBS 介质中的释放曲线形态类似，但在含 50% FBS 的 PBS 中初始阶段的释放速率较大，可能因为 FBS 的存在影响了制剂的稳定性，但总体影响较小。二者最终释放总量相当，在 48 h 内均可累积释放 50% 左右，表现出一定的缓释特性。本试验结果能够为 **1**-LP 的进一步研究奠定基础，同时为 PROTAC 类药物的递送提供思路，为肿瘤靶向新制剂设计提供依据；采用的制备与分析方法操作简单，方便可行，可为后续工业化生产提供便利。

参考文献：

[1]　HARRELL S D R, CLARK G J. Pumping the brakes on *RAS*-negative regulators and death effectors of *RAS* [J]. *J*

Cell Sci, 2020, **133**(3): jcs238865.

[2] SPENCER-SMITH R, O'BRYAN J P. Direct inhibition of *ras*: quest for the holy grail? [J]. *Semin Cancer Biol*, 2019, **54**: 138-148.

[3] JANES M R, ZHANG J C, LI L S, *et al*. Targeting *K-RAS* mutant cancers with a covalent $G_{12}C$-specific inhibitor [J]. *Cell*, 2018, **172**(3): 578-589.

[4] BURSLEM G M, CREWS C M. Proteolysis-targeting chimeras as therapeutics and tools for biological discovery [J]. *Cell*, 2020, **181**(1): 102-114.

[5] PAIVA S L, CREWS C M. Targeted protein degradation: elements of PROTAC design [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2019, **50**: 111-119.

[6] OTTIS P, CREWS C M. Proteolysis-targeting chimeras: induced protein degradation as a therapeutic strategy [J]. *ACS Chem Biol*, 2017, **12**(4): 892-898.

[7] SAKAMOTO M K, KIM K B, KUMAGAI A, *et al*. PROTACS: chimeric molecules that target proteins to the Skp_1-Cullin-F box complex for ubiquitination and degradation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**(15): 8554-8559.

[8] BONDESON D P, SMITH B E, BURSLEM G M, *et al*. Lessons in PROTAC design from selective degradation with a promiscuous warhead [J]. *Cell Chem Biol*, 2018, **25**(1): 78-87.

[9] SALAMI J, CREWS C M. Waste disposal–an attractive strategy for cancer therapy [J]. *Science*, 2017, **355**(6330): 1163-1167.

[10] BURSLEM G M, SMITH B E, LAI A C, *et al*. The advantages of targeted protein degradation over inhibition: an RTK case study [J]. *Cell Chem Biol*, 2018, **25**(1): 67-77.

[11] HU J, HU B, WANG M, *et al*. Discovery of ERD-308 as a highly potent proteolysis targeting chimera (PROTAC) degrader of estrogen receptor (ER) [J]. *J Med Chem*, 2019, **62**(3): 1420-1442.

[12] HAN X, WANG C, QIN C, *et al*. Discovery of ARD-69 as a highly potent proteolysis targeting chimera (PROTAC) degrader of androgen receptor (AR) for the treatment of prostate cancer [J]. *J Med Chem*, 2019, **62**(2): 941-964.

[13] ZHANG F Q, WU Z W, CHEN P, *et al*. Discovery of a new class of PROTAC BRD4 degraders based on a dihydroquinazolinone derivative and lenalidomide/pomalidomide [J]. *Bioorg Med Chem*, 2020, **28**(1): 115-228.

[14] RAINA K, LU J, QIAN Y M, *et al*. PROTAC-induced BET protein degradation as a therapy for castration-resistant prostate cancer [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, **113**(26): 7124-7129.

[15] WINTER G E, BUCKLEY D L, PAULK J, *et al*. Phthalimide conjugation as a strategy for *in vivo* target protein degradation [J]. *Science*, 2015, **348**(6241): 1376-1381.

[16] QI S M, DONG J Y, XU Z Y, *et al*. PROTAC: an effective targeted protein degradation strategy for cancer therapy [J]. *Front Pharmacol*, 2021, **12**: 692574.

[17] BOND M J, CHU L, NALAWANSHA D A, *et al*. Targeted degradation of oncogenic $K\text{-}RAS^{G12C}$ by VHL-recruiting PROTACs [J]. *ACS Cent Sci*, 2020, **6**(8): 1367-1375.

[18] HALLIN J, ENGSTROM L D, HARGIS L, *et al*. The $K\text{-}RAS^{G12C}$ inhibitor MRTX849 provides insight toward therapeutic susceptibility of *K-RAS*-mutant cancers in mouse models and patients [J]. *Cancer discov*, 2020, **10**(1): 54-71.

[19] PETTERSSON M, CREWS C M. Proteolysis targeting chimeras (PROTACs)—past, present and future [J]. *Drug Discov Today Technol*, 2019, **31**: 15-27.

[20] MAHALE N B, THAKKAR P D, MALI R G, *et al*. Niosomes: novel sustained release nonionic stable vesicular systems—an overview [J]. *Adv Colloid Interface Sci*, 2012, **183-184**: 46-54.

[21] HU J, WANG J, WANG G, *et al*. Pharmacokinetics and antitumor efficacy of DSPE-PEG2000 polymeric liposomes loaded with quercetin and temozolomide: analysis of their effectiveness in enhancing the chemosensitization of drug-resistant glioma cells [J]. *Int J Mol Med*, 2016, **37**(3): 690-702.

[22] DING Y, SUN D, WANG G L, *et al*. An efficient PEGylated liposomal nanocarrier containing cell-penetrating peptide and pH-sensitive hydrazone bond for enhancing tumor-targeted drug delivery [J]. *Int J Nanomedicine*, 2015, **10**: 6199-6214.

[23] KHALIL I A, KOGURE K, FUTAKI S, *et al*. Octaarginine-modified liposomes: enhanced cellular uptake and controlled intracellular trafficking [J]. *Int J Pharm*, 2008, **354**(1/2): 39-48.

[24] 柯 学, 王长江, 严 菲. 滤膜法测定多西紫杉醇脂质体的包封率[J]. 中国现代应用药学, 2008, **25**(4): 314-316.