

## 雄黄类抗癌制剂的专利研究进展

康琪<sup>1,2</sup>, 黄倩倩<sup>1</sup>, 曾洁<sup>1</sup>, 瞿礼萍<sup>1</sup>, 邹文俊<sup>1\*</sup>

(1. 成都中医药大学药学院, 成都 611137;

2. 四川中医药高等专科学校, 四川 绵阳 621000)

**[摘要]** 以专利为视角分析雄黄类抗癌制剂的研究进展,为雄黄抗肿瘤药物的研发提供借鉴与参考。在IncoPat数据库中以关键词加IPC分类号进行专利检索,人工去噪后共72件雄黄类抗癌制剂专利纳入研究范围,定量分析上述专利的申请趋势、申请类型和专利权人的相关信息,并以专利申请时间为线索对重点专利进行技术要点梳理。得到结果,①雄黄类抗癌制剂的专利类型以产品专利为主,其技术创新历经雄黄复方制剂研发、雄黄单方制剂研发、纳米雄黄制备方法研发、雄黄微生物浸出物研发、雄黄复方提取物制剂研发、复方纳米雄黄制剂研发及雄黄多晶型结构研发。②纳米雄黄制剂、雄黄微生物浸出制剂、雄黄新晶型制剂及雄黄复方制剂的开发是雄黄类抗癌制剂的当前研究热点。③不同制备工艺纳米雄黄的生物学效应和毒性的比较、纳米雄黄在抗肿瘤应用中的最佳粒径选择、雄黄微生物浸出制剂的成药性研究、高稳定性性能的As<sub>4</sub>S<sub>4</sub>新晶型发现以及已上市雄黄抗癌制剂的二次开发是雄黄类抗癌制剂的未来发展方向。

**[关键词]** 雄黄; 硫化砷; 抗癌; 肿瘤; 专利

**[中图分类号]** R284.2;R289;R22;R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)23-0226-09

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20202074

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200831.1755.010.html>

**[网络出版日期]** 2020-9-1 10:25

### Research of Anticancer Realgar Preparations from Perspective of Patent

KANG Qi<sup>1,2</sup>, HUANG Qian-qian<sup>1</sup>, ZENG Jie<sup>1</sup>, QU Li-ping<sup>1</sup>, ZOU Weng-jun<sup>1\*</sup>

(1. School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Chengdu 611137, China; 2. Sichuan College of TCM, Mianyang 621000, China)

**[Abstract]** To review the research progress of anticancer realgar preparations from the perspective of patent, in order to provide a reference for the research of new antitumor realgar drugs. IncoPat database was retrieved with keywords plus IPC classification number. Original data and 72 patents of anti-cancer realgar preparations were obtained and included after artificial denoising. The quantitative analysis was made on the information about application trends, application types and patentee. The technical points of representative patents were summarized. ① The patent types of anticancer realgar preparations are mainly product patents. Its technological innovation has undergone the development of realgar compound agents, arsenic sulfide single agents, nanometer products of realgar agents, bioleaching of realgar preparations, compound realgar extract preparations, compound nano realgar preparations and arsenic sulfide polymorphic crystalline structure. ② Nano realgar agents, realgar bioleaching preparations, new crystalline type realgar preparations and realgar compound preparations. ③ The following studies should be strengthened in the future, involving the comparison of biological effects and toxicity of nano realgar preparations of different preparation processes, the selection of optimal particle size, the druggability of realgar bioleaching preparations, the discovery of new As<sub>4</sub>S<sub>4</sub> crystalline

**[收稿日期]** 20200512(015)

**[基金项目]** 四川省哲学社会科学重点研究基地四川医事卫生法治研究中心项目(YF18-Q15)

**[第一作者]** 康琪,在读博士,讲师,从事中药知识产权研究工作,Tel:028-61800074,E-mail:36547041@qq.com

**[通信作者]** \* 邹文俊,博士,教授,从事中医药知识产权和中药国际化研究工作,Tel:028-61800074,E-mail:zouwenjun@163.com

forms and the secondary development of anticancer realgar preparations.

[Key words] realgar; arsenic sulfide; anticancer; tumor; patent

以雄黄(realgar, 主成分  $As_2S_2$  或  $As_4S_4$ ) 为代表的硫化砷类制剂虽然存在一定的毒性作用, 但药用历史悠久。现存最早的中药学专著《神农本草经》<sup>[1]</sup> 记载, 雄黄味苦平, 生山谷, 治寒热鼠瘻、恶疮疽痔、死肌等。2015年版《中国药典》<sup>[2]</sup> 载明, 雄黄的功能与主治为解毒杀虫、燥湿祛痰、截疟, 用于痈肿疔疮、蛇虫咬伤、虫积腹痛、惊痫、疟疾。古印度医学阿育吠陀<sup>[3]</sup>, 将雄黄为主要成分的 Bhasma 制剂用于某些慢性疾病的治疗。西方“医学之父”希波克拉底曾以局部给药的方式将硫化砷用于治疗溃疡<sup>[4]</sup>。从二十世纪七十年代起, 我国血液疾病领域研究者<sup>[5-14]</sup> 陆续将研发的三氧化二砷注射液及以雄黄为君药的中成药复方黄黛片/realgar-indigo naturalis formula (RIF) 应用于临床对急性早幼粒细胞白血病/acute promyelocytic leukemia (APL) 的治疗, 并取得确切疗效。基于上述研究成果, 三氧化二砷注射液陆续获得美国、欧盟、中国等多个国家的上市许可, 成为治疗 APL 的一线用药, 随后 RIF 也在国内获批上市。

现有研究指出, 以雄黄、砒霜(arsenic, 主成分  $As_2O_3$ ) 为代表的无机砷制剂不仅在 APL 的治疗中临床疗效显著, 其在急性髓性白血病<sup>[15]</sup>、慢性粒细胞白血病<sup>[16]</sup>、骨髓增生异常综合征<sup>[17-18]</sup>、淋巴瘤<sup>[19]</sup> 等恶性血液系统肿瘤以及骨髓瘤<sup>[20]</sup> 或骨肉瘤<sup>[21]</sup>、胃癌<sup>[22]</sup>、肝癌<sup>[23]</sup>、宫颈癌<sup>[24-26]</sup>、食管癌<sup>[27]</sup> 等原发性或转移性肿瘤的非临床研究中也有较为显著的药理效应。虽然无机砷制剂在抗癌领域的基础研究及临床研究均取得了一定的进展, 但无机砷制剂, 尤其是以静脉注射给药的三氧化二砷类注射剂的毒副作用及患者顺应性等问题不容忽视。研究表明, 硫化砷类制剂与三氧化二砷类制剂相比, 临床上治疗 APL 具有疗效好、毒性小的优点<sup>[28]</sup>, APL 患者口服 RIF 与全反式维甲酸联合用药后其治疗效果与静脉注射三氧化二砷联合全反式维甲酸的治疗效果相似, 但 APL 患者的顺应性及生活质量显著提升<sup>[29]</sup>。此外, RIF 以其低廉的价格和口服给药的方式显著降低 APL 患者的治疗费用, 为发展中国家的癌症患者带来希望<sup>[30]</sup>。鉴此, 越来越多的抗肿瘤药物研究开始更加关注雄黄类制剂的开发。由于新药研发具有投入高、周期长、风险高和收益高等特点, 其知识成果的产出高度依赖于专利保护。从新药研发

的视角剖析现有雄黄类抗癌制剂的专利信息, 能以雄黄为原料的抗肿瘤新药开发提供借鉴: 一来防止重复研究, 二来指明未来研发方向。但是, 目前尚未见有关雄黄抗癌制剂的专利分析研究。鉴于上述, 本文通过定量分析的方式对雄黄抗癌领域的专利文献进行分析和评估, 梳理重点专利的技术要点, 归纳出雄黄抗癌制剂的技术创新历程, 并结合雄黄抗肿瘤领域最新研究报道, 进一步分析雄黄类抗癌制剂的研究热点, 同时提出该领域未来研究发展方向的建议, 以期对雄黄类抗肿瘤药物的研发提供参考。

## 1 数据来源

利用 IncoPat 科技创新情报平台数据库(IncoPat 收录了全球 102 个国家/组织/地区 1 亿余件专利信息, 对 22 个主要国家的专利数据进行特殊收录和加工处理, 数据字段完善, 全球专利信息每周更新 3 次), 以关键词加 IPC 分类号的方式进行检索, 检索式为 TIABC=(雄黄 or 硫化砷 or arsenic sulfide or realgar or orpiment) and (瘤 or 癌 or cancer or carcinoma) and IPC=(A61), 共检出 498 条专利数据, 合并专利申请号后共 403 件专利; 检索时间 2020 年 3 月 15 日; 数据处理逐一阅读初检结果中的各项专利, 排除权利要求 1 中涉及药味为 10 味及以上的含有雄黄的复方专利及其他发明点与雄黄无关的专利; 专利纳入结果人工去噪后共 72 件专利纳入本文的研究范围。

## 2 专利数据分析

### 2.1 专利申请趋势分析

雄黄类抗癌制剂的专利申请始于 1990 年, 1993 年前实施的《专利法》对“药品和用化学方法获得的物质”不授予专利权, 仅保护药品的制备方法<sup>[31]</sup>。因此, 1990 年至 1993 年间的 3 件雄黄复方专利均以制备方法的方式予以保护。1992 年至 1997 年间陆续有治疗或预防不同类型癌症的雄黄复方制剂的专利被公开。1998 年, 国内申请人陆道培最早对硫化砷单方制剂进行专利申请, 同年其在多个国家和地区共申请了 15 件同族专利。除四川兴科蓉药业有限责任公司于 2017 年和 2018 年申请的两件单方雄黄的多晶型产品专利外, 1999 年至 2016 年间的专利主要与雄黄复方制剂、纳米雄黄制备方法和雄黄微生物浸出液有关。

### 2.2 专利类型分析

根据专利文本中独立权力

要求主题将研究范围内的专利申请进行分类,同一专利申请中可能同时包括产品、产品制备方法、用途等多种权利要求保护主题,本文以权力要求/主权利要求/独立权利要求所记载的内容作为分类依据。分析结果显示,雄黄类抗癌制剂与产品主题最为相关,共计61件,占比85%,其中复方产品39件,单方产品22件。雄黄类抗癌制剂专利中有7件专利与纳米雄黄制剂的制备方法相关,有4件专利与雄黄抗肿瘤的新用途相关。

**2.3 专利权人分析** 从全球范围看,该技术领域的专利权人主要来自中国(占比98.6%),我国在该领域的专利申请中占有比较明显的优势。从专利权人类型看,个人申请43件(占比60%),企业申请13件(占比18%),高校申请12件(占比16%),医院申请5件(占比7%)。个人申请中除陆道培对雄黄单方制剂的19件专利申请以及李红玉对雄黄生物浸出液制备方法的2件专利申请外,其余专利权人为

个人的专利申请量均只有1件,且以复方制剂居多。此外,仅陆道培、上海中医药大学、四川兴科蓉药业有限责任公司三位专利权人进行了国外专利布局。

### 3 重点专利分析

本文专利价值评价主要依据 IncoPat 数据库中合享价值度,该合享价值度通过专利价值评价模型实现,评价指标包括专利类型、被引证次数、同族个数、同族国家申请量、权利要求个数、发明人个数、涉及IPC大组个数、专利剩余有效期等,合享价值度从低到高分为1至10个等级。以下内容将以雄黄类抗癌制剂专利申请时间为线索,对复方产品、单方产品、纳米制备方法等合享价值度大于等于4的重点专利进行技术分析。复方产品专利包括传统中药复方制剂、中药提取物复方制剂和含有纳米雄黄的复方制剂;单方产品专利包括雄黄单方制剂、雄黄多晶型制剂和雄黄的生物浸出物制剂。详见表1。

表1 雄黄复方抗癌制剂的重点专利

Table 1 Important patents of realgar anti-cancer compound preparation

序号	复方类型	申请日	专利公开号	复方组成	抗肿瘤范围	合享价值度
1	复方药味	1991-12-21	CN1061908A	白砒、明矾、雄黄、没药	宫颈癌	7
2	复方药味	1994-11-19	CN1111515A	麦饭石、钟乳石、磁石、礞石、阳起石、密陀僧、禹粮石、雄黄、自然铜、风化煤	广谱	5
3	复方药味	1995-12-13	CN1053829C	麝香、黄柏、青黛、苦参、雄黄、冰片	宫颈癌	5
4	复方药味	2000-05-26	CN1183919C	西洋参、鳖甲、法半夏、蟾酥、麝香、土鳖虫、丹参、山慈姑	广谱	7
5	复方药味	2000-05-28	CN1148200C	乌梅、硼砂、雄黄、乳香、黑豆、绿豆、朱砂、百草霜	广谱	6
6	复方药味	2000-09-27	CN1345594A	巴豆霜、雄黄、荞麦粉、大黄、黄连	淋巴瘤、乳腺肿瘤	4
7	复方药味	2003-09-29	CN1283272C	雄黄、甘草	维甲酸耐药复发及难治性白血病M3	7
8	复方药味	2004-09-15	CN100393329C	雄黄、青黛、丹参、太子参	白血病	8
9	复方药味	2005-03-21	CN1836707A	香菇、灵芝、茶叶、红景天、皂矾、β-胡萝卜素、纯化雄黄、蜂胶、元明粉	广谱	6
10	复方药味	2005-09-1	CN1923232B	蜈蚣、穿山甲、僵蛹、全蝎尾、鳖甲、龟板、雄黄、大黄、朱砂	广谱	7
11	复方药味	2006-07-16	CN100435808C	明矾、火硝、水银	白血病,脑瘤,食道癌,肺癌,胃癌,肠癌,胰腺癌,子宫及附件前列腺癌	7
12	复方药味	2008-11-28	CN101411857A	生姜、雄黄、川芎、天麻、水蛭、三七、石菖蒲	脑瘤	6
13	复方提取物	2010-01-11	CN102119958B	雄黄微生物浸出液、人参提取物、黄芪提取物、苦参素	广谱	9
14	复方药味	2011-04-27	CN102755402B	雄黄、枇杷叶	肺癌	5

续表 1

序号	复方类型	申请日	专利公开号	复方组成	抗肿瘤范围	合享价值度
15	复方药味	2012-05-28	CN102716414A	褐藻多糖硫酸酯、雄黄、半枝莲、 大黄、莪术	广谱	4
16	复方药味	2012-07-15	CN102940682A	雄黄、蜈蚣、马钱子、全蝎、丹参、 鸡内金	食道癌、胃癌	4
17	复方提取物	2013-06-19	CN101890042B	四硫化四砷、靛玉红、丹参酮II <sub>A</sub>	白血病包括急性淋巴细胞性白血病、急性 髓性白血病、慢性粒细胞性白血病和慢性淋 巴细胞性白血病	8
18	复方纳米	2013-06-26	CN104161785B	乳香和没药挥发油固体脂质纳米 粒、载纳米雄黄微囊、牛黄微粉、麝 香微粉	广谱	10
19	复方纳米	2014-02-13	EP2845599B1	乳香和没药挥发油固体脂质纳米 粒、载纳米雄黄微囊、牛黄微粉、麝 香微粉	广谱	9
20	复方纳米	2014-02-13	US20150086643A1	乳香和没药挥发油固体脂质纳米 粒、载纳米雄黄微囊、牛黄微粉、麝 香微粉	广谱	8
21	复方纳米	2014-02-13	WO2014206093A1	乳香和没药挥发油固体脂质纳米 粒、载纳米雄黄微囊、牛黄微粉、麝 香微粉	广谱	9
22	复方药味	2015-12-17	CN105362340A	雄黄、青黛、丹参、太子参	白血病	10
23	复方药味	2016-09-22	KR101900802B1	白花蛇舌草、丹参	肺癌	7
24	复方纳米	2017-03-01	CN106728924A	青黛(纳米),雄黄(纳米),白花蛇 舌草,山豆根,蛹虫草,丹参,龙胆 草,山慈菇	白血病	5
25	复方药味	2017-03-09	CN106890268B	青黛、雄黄、白花蛇舌草、山豆根、 蛹虫草、丹参、龙胆草、山慈菇	白血病	8

**3.1 复方产品专利** 1990年,第一份含雄黄的复方制剂专利CN1056425A公开,该复方制剂可用于治疗中风和肿瘤等。1991年,CN1061908A专利公开了一种包括雄黄在内的4味中药的抗癌药物的制造方法。随后,CN1053829C专利公开了含有包括麝香、黄柏、青黛、苦参、雄黄、冰片的外用制剂,其可用于预防和治疗宫颈癌。

2003年,西安交通大学公开了一种抗癌药物及其制备方法专利CN1283272C,该抗癌药物由雄黄及甘草组成,其制备方法是将雄黄通过胶体磨,使雄黄胶体化;加入稀盐酸浸泡后用水进行冲洗并干燥,加入甘草粉,进行灭菌;然后装入胶囊即成。

2004年,中国人民解放军第210医院的黄世林团队申请了抗白血病的中药制剂RIF及其制备方法专利CN100393329C,该制剂中各组分及其所占质量分数是雄黄12%~18%,青黛25%~42%,丹参36%~46%,太子参12%~18%。制备方法是将雄黄、青黛和太子参细粉按质量百分比混匀备用;将丹参

加10~14倍量水,煎煮3~5次,每次1~2h,滤过,将3~5次滤液合并,在温度48~54℃条件下,浓缩至相对密度为1.25~1.55的浸膏;再将丹参浸膏加入上述3种药物组分的混匀细粉中,调匀,制粒,干燥,再加入1%的硬酯酸镁,混匀,整粒,压片重0.25~0.30g,包衣。

2008年,上海瑞金医院研究团队申请了一种中药复方制剂砷靛参及其制备方法专利CN101890042B,其中该中药复方制剂中的活性组分四硫化四砷、靛玉红和丹参酮II<sub>A</sub>的质量比为(1~10):1:1。药理实验结果显示,中药复方制剂砷靛参可治疗多种白血病、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征、淋巴瘤、肝癌、肺癌、胃癌、食管癌、乳腺癌、胰腺癌和肠癌等实体瘤。

2015年,亿帆鑫富药业股份有限公司提交了国内申请CN105362340A,该专利在原RIF专利组方构成基础上进行改进,将丹参的质量分数由36%~46%提高到50%~60%,将雄黄由12%~18%降低为

2%~8%。与原有专利相比,该专利所保护的技术方案在疗效上有了明显的提高与改善(完全缓解率提高约10%),并且毒副作用大幅降低,服用安全性有了明显保障。见表1。

**3.2 单方产品专利** 1998年之前,虽然雄黄已作为治疗或预防不同类型癌症的复方组合物的成分之一,但是单独使用雄黄治疗癌症,尤其是白血病或淋巴瘤,仍处于研发空白阶段。1998年,陆道培对雄黄单方制剂申请专利CN1175823C,随后,其围绕雄黄类制剂在18个国家和地区申请了19件专利。其专利保护内容覆盖了砷的硫化物治疗APL或非何杰金氏淋巴瘤等肿瘤的用途,砷的硫化物与其他化疗药物联用治疗APL,用植物种子作为砷的硫化物的载体,以及包括给药周期的治疗方法等。

2007年,CN101120950A专利公开了雄黄微生物浸出液在制备抗肿瘤药物中的应用,该专利中雄黄微生物浸出液按照CN1839880B公开的微生物处理方法制备,该发明所提供的雄黄浸出液对包括肝

癌、胃癌、白血病、肺癌等在内的多种癌细胞有明显的抑制作用,并且用量少仅为微克级。此外,由于雄黄微生物浸出液是一种可溶性的药物,因此可以单独或与其他药物配伍及添加药学上可以接受的辅料,易制成各种制剂,包括栓剂、丸剂、颗粒剂、膜剂、微囊剂、滴丸剂、气雾剂、酒剂、糖浆剂、口服液、注射液或注射粉针剂等。

2017年,四川兴科蓉药业有限责任公司申请了CN108498542A专利,该发明公开了雄黄的多晶型结构 $\beta$ -As<sub>4</sub>S<sub>4</sub>,为单斜晶系;环状分子型结构;空间群C2/c(15); $a_0=9.957\ 00\ \text{nm}$ , $b_0=9.335\ 00\ \text{nm}$ , $c_0=8.889\ 00\ \text{nm}$ , $\beta=102.380$ ,以及该晶体结构在治疗血液系统恶性肿瘤的用途。

**3.3 方法专利** 雄黄抗癌制剂相关专利独立权利要求所保护主题为方法的专利均与纳米制备方法相关。雄黄类制剂借助纳米技术具有增加生物利用度、提高靶向性、调整缓释控释等优势<sup>[32]</sup>。见表2。

表2 雄黄抗癌制剂制备方法类重点专利

Table 2 Important patents for preparation of realgar anti-cancer preparations

序号	申请日	专利公开号	技术要点	合享价值度
1	2000-09-25	CN1116028C	把雄黄制成纳米级(1~100 nm)的细微粉粒,从而赋予雄黄以更高的药效和抗肿瘤作用,实现纳米雄黄的方法是:①温度可控真空或惰性气氛高能球磨法;②超音速气流粉碎法。	6
2	2003-07-08	CN1299668C	纳米雄黄固体分散体以纳米雄黄为活性成分,以高分子聚合物为载体,还添加有抗氧化剂和表面活性剂,此发明很好的解决了纳米雄黄的氧化与团聚问题。	9
3	2005-03-05	CN100374463C	提供一种用生物大分子模板调控形貌与粒径制备纳米雄黄胶体及纳米雄黄的方法	7
4	2006-01-06	CN1823841A	提供了一种作为治疗肿瘤药物的雌黄纳米粒的制备工艺,即以As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ,硫代乙酰胺(TAA),盐酸为原料,以无水乙醇作溶剂,通过控制反应物浓度,在一定反应温度下制备了直径大小为60~140 nm的雌黄纳米粒	5
5	2010-11-09	CN101982177A	柔性纳米雄黄脂质体及其制备方法和用途,采用纳米中药技术处理雄黄,将雄黄制成膜形柔性纳米雄黄脂质体	4
6	2013-12-02	CN103611172B	载纳米雄黄磁性白蛋白纳米球及制备方法,包括如下步骤,利用改良的化学共沉淀法制备四氧化三铁纳米粒和纳米雄黄;利用去溶剂化~交联法制备载纳米雄黄磁性白蛋白纳米球。	6
7	2017-04-15	CN107320489A	普通雄黄通过罐体快速的多维摆动式运动,使磨介在罐内的不规则运动产生巨大的冲击力;延长磨介的运动轨迹、提高冲击能、减少撞击盲点,其工作效率是传统工艺的几十倍可以显著提高罐内磨介的冲击能量和运动次数,使被粉碎的雄黄达到纳米级;同时,大大提高了被雄黄颗粒的均匀度	5

2000年,CN1116028C专利利用温度可控真空或惰性气氛高能球磨法和超音速气流粉碎法实现了纳米雄黄的制备。虽然纳米雄黄显著提高了雄黄生物利用度和抗肿瘤效果,但在使用过程中存在着纳米雄黄的主成分As<sub>2</sub>S<sub>2</sub>被氧化和出现团聚现象的问题,影响了纳米雄黄药效的发挥。针对以上问题,2003年申请的CN1299668C专利,公开了纳米雄黄固体分散体以解决纳米雄黄的氧化与团聚问题。

2003年,CN103611172B专利公开了载纳米雄黄磁性白蛋白纳米球及制备方法,其制备方法包括如下步骤,利用改良的化学共沉淀法制备四氧化三铁纳米粒和纳米雄黄;利用去溶剂化~交联法制备载纳米雄黄磁性白蛋白纳米球。

2007年,安徽天康药业有限公司申请专利CN107320489A,该专利公开了普通雄黄通过罐体快速的多维摆动式运动,使被粉碎的雄黄达到

纳米级。

此外,雄黄在抗肿瘤领域的新用途专利较少,2016年兰州大学申请的涉及雄黄微生物浸出液的新用途CN109718248A专利处于在审状态,其他新用途专利包括雄黄在制备治疗皮肤肿瘤疾病药物的CN101884647A专利及雄黄在制备治疗胃癌疾病药物的CN101884648A专利。

#### 4 雄黄抗癌制剂研究热点与未来研究方向

通过前述对雄黄类抗癌制剂的专利信息分析,发现其技术创新历经了以RIF为代表的中药雄黄复方制剂研发、硫化砷化合物单方制剂研发、纳米雄黄制备方法研发、雄黄微生物浸出物研发、以砷酸参制剂为代表的复方雄黄提取物制剂研发、复方纳米雄黄制剂研发及雄黄多晶型结构研发的历程。以下结合雄黄抗肿瘤领域最新研究进展,进一步分析雄黄类抗癌制剂的研究热点,同时拟提出该领域未来研究发展方向的建议。见图1。



图1 雄黄类抗癌制剂的研发进程

Fig. 1 Research and development of realgar anticancer agents

**4.1 纳米雄黄抗癌制剂** 中药纳米载药制剂能够有效提高治疗肿瘤的疗效,实现药物对肿瘤的主动或被动靶向治疗,减少给药剂量和不良反应,提高治疗效果等优势<sup>[33]</sup>,从上世纪90年代起纳米制剂的开发持续成为雄黄抗癌制剂的研究热点。2000年,雄黄类纳米抗癌制剂的首件专利CN1116028C提出申请,后续专利陆续披露了用生物大分子模板调控和磁性白蛋白等方法的纳米雄黄制备工艺。不同制备工艺产出的纳米雄黄的粒径从6~200 nm不等<sup>[34]</sup>,粒径<150 nm的纳米雄黄与其他粒径相比,能明显抑制 ECV-304 细胞的生长<sup>[35]</sup>,粒径<20 nm的纳米雄黄,即雄黄量子点(realgar quantum dots, RQDs),具有独特的光学性能,在显著抑制部分谱系癌细胞增殖的同时具有较小的细胞毒性<sup>[36-37]</sup>。以上研究表明,纳米雄黄的抗肿瘤效果和细胞毒性大小与其粒径密切相关。因此,纳米雄黄制剂的相关研究中应加强对不同制备工艺纳米雄黄的生物学效应和毒性的比较研究,探寻纳米雄黄在抗肿瘤应

用中的最佳粒径。目前尚未发现与纳米雄黄抗癌制剂质量监测技术相关的报道,如何监测纳米雄黄是否达到最佳粒径,其相关的质量标准、评价指标及检测依据,也是值得研究的问题。

**4.2 雄黄微生物浸出物制剂** 微生物浸出技术是近年来发展起来的一项湿法冶金技术,该技术与雄黄传统制备方法相比能显著增强雄黄的可溶性和生物利用度,并且该方法具有效率高、环境友好度高、低成本的特性<sup>[38]</sup>。兰州大学李红玉团队在微生物冶金生产金属铜矿的技术启示下,2006年申请了矿物药经细菌处理的溶解方法专利CN1839880B,随后其团队将该专利技术用于雄黄微生物浸出物制剂的制备。随着雄黄生物转化过程中存在砷的溶出与移除的双效作用的发现<sup>[39]</sup>,相关研究者开始进一步优化 *A. ferrooxidans* BY-3 对生物转化雄黄的最佳转化条件<sup>[40]</sup>。此外,生物转化还可有效解决传统雄黄炮制与贮存中面临的两大难题:氧化与光化作用对雄黄品质与药效的不利影响<sup>[41]</sup>。现有文献研究表明雄黄微生物浸出物制剂具有较大的开发空间,相关研究人员应加强雄黄微生物浸出物制剂在药效学、药代动力学和安全性等的研究,以进一步验证其成药性。

**4.3 雄黄新晶型制剂** 雄黄的主要成分  $As_4S_4$  属单斜晶系结晶,具有多种晶型<sup>[42]</sup>,而同一药物的不同晶型在外观、溶解度、熔点、溶出度和生物等效性等方面可能会有显著不同,从而影响药物的稳定性、生物利用度及疗效<sup>[43]</sup>。药物晶型研究,一方面可以改善原料药溶解性缺陷的问题,另一方面可以为创新药物提供继分子结构之后的第二次物质层面的保护,有限延长市场占有率<sup>[44]</sup>。四川兴科蓉药业的研究人员开展了对  $\beta-As_4S_4$  晶型的开发,并于2017年申请了产品专利CN108498542A,同时基于该专利的优先权递交了PCT(patent cooperation treaty)申请。虽然雄黄类抗癌制剂的最新专利指向雄黄新晶型的研发,但当前雄黄新晶型在抗肿瘤领域的研究尚处于起步阶段,寻找更多临床疗效佳、安全性高的  $As_4S_4$  新晶型将是雄黄抗癌制剂的未来发展方向。此外,药用晶型物质的稳定性会影响到药品的临床有效性和安全性,故还需要加强对雄黄多晶型抗癌制剂进行晶型物质状态的稳定性研究,包括原料药成分的晶型物质状态的稳定性、原料药晶型物质于制剂处方中各种辅料的相容性、制剂工艺对原料药晶型物质状态的影响等<sup>[45]</sup>。

**4.4 雄黄复方抗癌制剂** 复方用药是传统中医药

的特色所在,也是中药新药研发的源泉。根据国家药监局药品数据库(<http://www.nmpa.gov.cn/WS04/CL2043/>)公开的信息,截至2020年5月,我国已上市中成药组方含有雄黄的品种包括RIF等共计152个,均为复方制剂。虽然雄黄类抗癌制剂的专利申请情况与已上市中成药情况类似,以复方申请为主,但就某一个具体的复方制剂而言,专利数量较少,专利保护范围较窄,专利保护力度有待提升。RIF作为雄黄类抗癌制剂的典型代表,已在我国批准上市,其以口服给药的方式治疗APL疗效显著,相关临床研究已被新英格兰医学杂志(*New England Journal of Medicine*), *Lancet Oncology*<sup>[29,46-50]</sup>等全球顶级期刊认可。虽然,RIF作为具有我国自主知识产权的复方中成药,国际影响巨大,但当前RIF的专利保护情况不容乐观。RIF共申请两件国内专利,核心专利CN100393329C,权利要求只保护片剂一种剂型,并在2011年因专利权人未缴纳专利年费而提前终止;后续专利CN105362340A也只是对原专利组方含量进行改进,保护力度较弱。因此,相关研究人员尚需对已上市复方产品进行不断挖掘与创新,从剂型、制备工艺、检测方法、与顺铂和紫杉醇等抗肿瘤药物的联合用药、在血液肿瘤及实体瘤的新用途等方面进行进一步的研究,实现对产品的二次开发创新。在雄黄复方抗癌制剂的新药研发过程中还应树立“专利先行,产品在后”的观念<sup>[51]</sup>,加强对高价值拳头产品的国内外专利布局,以形成我国在该领域的商业竞争优势。

此外,虽然现有研究发现雄黄通过诱导肿瘤细胞凋亡、抑制癌细胞增殖及影响肿瘤血管生成等<sup>[52-59]</sup>作用机制达到抗肿瘤的作用,但当前实验研究尚未从分子水平深入系统地阐释雄黄的抗肿瘤作用的分子生物学机制,雄黄在体内分解代谢的中间产物与药效物质的相关研究甚少<sup>[60]</sup>。因此,本领域研究人员在对现有技术热点及其研究趋势有较好把握的基础上,还应加强雄黄抗肿瘤的基础研究。

## 5 展望

国际癌症研究中心在《全球癌症报告》中指出<sup>[61]</sup>,2018年全球新增1810万例癌症病例,死亡人数达960万,全球癌症负担进一步加重。虽然雄黄抗癌专利大多数都强调了其在实体瘤中的应用,但目前除细胞和动物水平的临床前基础研究外,尚未见雄黄用于实体瘤治疗的临床研究报道<sup>[62]</sup>,雄黄在

实体瘤中的临床应用还值得研究者们进一步关注。雄黄类抗癌制剂的当前研究热点聚焦于纳米制剂、微生物浸出制剂、新品型制剂及复方制剂的开发。虽然Abraxane(白蛋白纳米紫杉醇)等天然药物纳米抗癌制剂已获得FDA批准上市,纳米抗癌制剂的前景广阔,但纳米雄黄制剂尚未应用于临床,原因可能与纳米雄黄缺乏质量标准有关。微生物浸出技术虽然在增强雄黄的可溶性和生物利用度方面为我们研究雄黄抗癌制剂提供了新的思路和方法,但其成药性问题尚需进一步验证。雄黄抗癌制剂的新品型研究能改善原料药溶解性缺陷的问题,但其稳定性问题不容忽视,故还需要加强这方面研究。随着现代新技术、新设备及新辅料的快速发展,未来必将有更多的雄黄抗癌制剂突破实验室研究服务于临床。

## [参考文献]

- [1] 佚名. 神农本草经[M]. 北京:北京科学技术出版社, 2016:33.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2015:336-337.
- [3] PARMAR D K, PATGIRI B J, PRAJAPATI P K. Standardization of Gaja Puta and Ardha Gaja Puta in the preparation of Vanga Bhasma [J]. *Ayu*, 2010, 31(4):511-515.
- [4] THOMAS X, TRONCY J. Arsenic: a beneficial therapeutic poison-a historical overview [J]. *Adler Mus Bull*, 2009, 35(1):3-13.
- [5] 张亭栋,荣福祥. 癌灵一号注射液与辨证论治治疗急性粒细胞型白血病[J]. *黑龙江医药*, 1979(4):7-11.
- [6] 孙鸿德,马玲,胡晓晨,等. 癌灵1号结合中医辨证施治急性早幼粒细胞白血病长期存活16例报告[J]. *中医药信息*, 1991(6):39-41.
- [7] 陈国强,陈赛娟,王振义,等. 氧化砷注射液治疗早幼粒细胞性白血病的机制研究及展望[J]. *中国中西医结合杂志*, 1998(10):581-582.
- [8] HUANG S L, GUO A X, XIANG Y, et al. Clinical study on the treatment of APL mainly with composite Indigo Naturalis tablets [J]. *Chin Med J*, 1995, 100:949-953.
- [9] LU D P, QIU J Y, JIANG B, et al. Tetra-arsenic tetrasulfide for the treatment of acute promyelocytic leukemia: a pilot report [J]. *Blood*, 2002, 99(9):3136-3143.
- [10] 方永光,黄世林,成玉斌,等. 复方黄黛片治疗急性早幼粒细胞白血病并发DIC的临床研究[J]. *临床血液学杂志*, 2010, 23(5):562-563.

- [11] NIU C, YAN H, YU T, et al. Studies on treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide: remission induction, follow-up, and molecular monitoring in 11 newly diagnosed and 47 relapsed acute promyelocytic leukemia patients [J]. *Blood*, 1999, 94(10):3315-3324.
- [12] CHEN Z, CHEN G Q, SHEN Z X, et al. Treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic compounds: *in vitro* and *in vivo* studies [J]. *Semin Hematol*, 2001, 38(1):26-36.
- [13] ZHANG X W, YAN X J, ZHOU Z R, et al. Arsenic trioxide controls the fate of the PML-RAR $\alpha$  oncoprotein by directly binding PML [J]. *Science*, 2010, 328(5975):240-243.
- [14] ZHU H H, QIN Y Z, HUANG X J. Resistance to arsenic therapy in acute promyelocytic leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2014, 370(19):1864-1866.
- [15] KUMAR S, YEDJOU C G, TCHOUNWOU P B. Arsenic trioxide induces oxidative stress, DNA damage, and mitochondrial pathway of apoptosis in human leukemia (HL-60) cells [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2014, 33(1):42.
- [16] 唐强, 沈杰, 刘昭前. 复方青黄胶囊治疗慢性粒细胞白血病6例临床报道 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2007, 12(4):478-480.
- [17] HU X M, TANAKA S, ONDA K, et al. Arsenic disulfide induced apoptosis and concurrently promoted erythroid differentiation in cytokine-dependent myelodysplastic syndrome-progressed leukemia cell line F-36p with complex karyotype including monosomy 7 [J]. *Chin J Integr Med*, 2014, 20(5):387-393.
- [18] HU X M, LIU F, MA R. Application and assessment of Chinese arsenic drugs in treating malignant hematopathy in China [J]. *Chin J Integr Med*, 2010, 16(4):368-377.
- [19] LI H M, LONG Y, QING C, et al. Arsenic trioxide induces apoptosis of burkitt lymphoma cell lines through multiple apoptotic pathways and triggers Antiangiogenesis [J]. *Oncol Res*, 2011, 19(3):149-163.
- [20] CHOLUJOVA D, BUJNAKOVA Z, DUTKOVA E, et al. Realgar nanoparticles versus ATO arsenic compounds induce *in vitro* and *in vivo* activity against multiple myeloma [J]. *Br J Haematol*, 2017, 179(5):756-771.
- [21] WANG G, ZHANG T, SUN W, et al. Arsenic sulfide induces apoptosis and autophagy through the activation of ROS/JNK and suppression of Akt/mTOR signaling pathways in osteosarcoma [J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 106:24-37.
- [22] ZHANG L, TIAN W, KIM S, et al. Arsenic sulfide, the main component of realgar, a traditional Chinese medicine, induces apoptosis of gastric cancer cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2014, 9:79-92.
- [23] 宋海林, 王雪雯, 段晶晶, 等. 三氧化二砷对肝癌 HepG2 细胞形成血管生成拟态的影响及其机制 [J]. *吉林大学学报:医学版*, 2014(4):715-719.
- [24] CHENG Y X, LIU R, WANG Q, et al. Realgar-induced apoptosis of cervical cancer cell line Siha via cytochrome c release and caspase-3 and caspase-9 activation [J]. *Chin J Integr Med*, 2012, 18(5):359-365.
- [25] YU J, QIAN H, LI Y, et al. Therapeutic effect of arsenic trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) on cervical cancer *in vitro* and *in vivo* through apoptosis induction [J]. *Cancer Biol Ther*, 2007, 6(4):580-586.
- [26] CHANG Y W, CHEN M W, CHIU C F, et al. Arsenic trioxide inhibits CXCR4-mediated metastasis by interfering miR-520h/PP2A/NF- $\kappa$ B signaling in cervical cancer [J]. *Ann Surg Oncol*, 2014, 21(S4):687-695.
- [27] 邓友平, 林晨, 张雪艳, 等. 三氧化二砷诱导人食管癌 Ec109 细胞凋亡伴随 c-Myc 基因的降调节 [J]. *中国医学科学院学报*, 2000, 22(1):67-70.
- [28] LU D P, WANG Q. Current study of APL treatment in China [J]. *Int J Hematol*, 2002, 76(S1):316-318.
- [29] ZHU H H, HUANG X J. Oral arsenic and retinoic acid for non-high-risk acute promyelocytic leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2014, 371(23):2239-2241.
- [30] ZHU H H, HU J, GU X F. Arsenic as traditional Chinese medicine provides new hope for overcoming high treatment costs of acute promyelocytic leukemia [J]. *J Glob Oncol*, 2016, 2(6):442-443.
- [31] 程永顺, 吴莉娟. 中国药品专利链接制度建立的探究 [J]. *科技与法律*, 2018(3):1-10.
- [32] 叶寒青. 纳米雄黄抗肿瘤作用机理研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2005.
- [33] 庞晓晨, 柴仲秋, 李玥, 等. 中药纳米载药系统用于肿瘤治疗的研究进展 [J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(11):5321-5323.
- [34] 覃钰. 雄黄量子点的抗肿瘤研究 [D]. 遵义: 遵义医学院, 2015.
- [35] DENG Y, XU H, HUANG K, et al. Size effects of realgar particles on apoptosis in a human umbilical vein endothelial cell line: ECV-304 [J]. *Pharmacol Res*, 2001, 44(6):513-518.

- [36] WANG N, WANG L W, GOU B D. Realgar-induced differentiation is associated with MAPK pathways in HL-60 cells [J]. *Cell Biol Int*, 2008, 32 (12) : 1497-1505.
- [37] WANG N, WANG L W, GOU B D, et al. Preparation of realgar nanoparticle suspension and its inhibition effect on the proliferation of human myelocytic leukaemia HL-60 cells [J]. *J Dispers Sci Technol*, 2009, 30(2):237-240.
- [38] 陈朋,李红玉. 雄黄的临床应用与炮制方法研究进展 [J]. *中华中医药学刊*, 2014, 32(7):1663-1666.
- [39] CHEN P, YAN L, LENG F, et al. Bioleaching of realgar by *Acidithiobacillus ferrooxidans* using ferrous iron and elemental sulfur as the sole and mixed energy sources [J]. *Bioresour Technol*, 2011, 102 (3) : 3260-3267.
- [40] CHEN, P, YAN, L, YUE, X X, et al. Optimal parameters for bioleaching of realgar using *Acidithiobacillus ferrooxidans* under different growth conditions and mathematical analysis [J]. *Biocatal Biotransfor*, 2013, 31(1):33-41.
- [41] CHEN P, YAN L, WANG Q, et al. Surface alteration of realgar (As<sub>4</sub>S<sub>4</sub>) by *Acidithiobacillus ferrooxidans* [J]. *Int Microbiol*, 2012, 15(1):9-15.
- [42] 李钢,程永科,黄长高,等. 矿物药雄黄的结构与热稳定性研究 [J]. *南京师大学报:自然科学版*, 2008, 31 (3):69-73.
- [43] 王先恒,许巧珊,赵长阔. 基于专利分析的我国药物晶型进展研究 [J]. *中国新药杂志*, 2017, 26(8) : 845-850.
- [44] 杨世颖,周健,张丽,等. 我国化学药物晶型研究现状与进展 [J]. *医药导报*, 2019, 38(2):48-53.
- [45] 吕扬,张丽,杨世颖,等. 多晶型药品的质量控制技术与方法应用要求 [J]. *中国新药杂志*, 2014, 23(7) : 759-763.
- [46] ZHU H H, HU J, GU X F. Arsenic as traditional Chinese medicine provides new hope for overcoming high treatment costs of acute promyelocytic leukemia [J]. *J Glob Oncol*, 2016, 2(6):442-443.
- [47] ZHU H H, WU D P, JIN J, et al. Long-term survival of acute promyelocytic leukaemia patients treated with arsenic and retinoic acid [J]. *Br J Haematol*, 2016, 174 (5):820-822.
- [48] ZHU H H, GUO Z P, JIA J S, et al. The impact of oral arsenic and all-trans-retinoic acid on coagulopathy in acute promyelocytic leukemia [J]. *Leuk Res*, 2017, 65: 14-19.
- [49] WANG F, JIA J S, WANG J, et al. The kinetics of white blood cell and the predictive factors of leukocytosis under oral or intravenous arsenic as the first-line treatment for acute promyelocytic leukemia [J]. *Leuk Res*, 2017, 61:84-88.
- [50] ZHU H H, WU D P, DU X, et al. Oral arsenic plus retinoic acid versus intravenous arsenic plus retinoic acid for non- high- risk acute promyelocytic leukaemia: a non-inferiority, randomised phase 3 trial [J]. *Lancet Oncol*, 2018, 19(7):871-879.
- [51] 施晴,吴晖晖,黄沛,等. 基于专利导航的我国中药姜黄产业链SWOT分析 [J]. *中药材*, 2017, 40(6):1284-1289.
- [52] WANG H, LIU S, LU X, et al. Gene expression profile changes in NB<sub>4</sub> cells induced by realgar [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2003, 116(7):1074-1077.
- [53] 刘延方,江滨,陆道培. 硫化砷诱导NB4细胞凋亡及细胞周期阻滞的研究 [J]. *中华血液学杂志*, 2000 (12):30-31.
- [54] CHEN S, FANG Y, MA L, et al. Realgar-induced apoptosis and differentiation in all-trans retinoic acid (ATRA)-sensitive NB4 and ATRA-resistant MR2 cells [J]. *Int J Oncol*, 2011, 40(4) : 1089-1096.
- [55] 陈思宇,刘陕西,李信民. 雄黄对急性早幼粒细胞白血病细胞诱导凋亡和促进分化的双重作用 [J]. *西安交通大学学报:医学版*, 2002, 23(4):401-404.
- [56] 罗丽云,张天蓝,王夔,等. 雄黄纳米微粒对人白血病细胞株HL-60的诱导分化作用 [J]. *中国中药杂志*, 2006, 31(16):1343-1346.
- [57] 周思彤,王永胜,易娟,等. 纳米雄黄对白血病K562细胞及其干细胞的凋亡诱导作用 [J]. *中药药理与临床*, 2013, 29(2):105-108.
- [58] 裴可,冯慧超,郑文利,等. 纳米雄黄抗肿瘤的药理毒理研究及临床应用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(5):214-219.
- [59] 陈国强,朱军,石学耕,等. 氧化砷诱导早幼粒细胞白血病细胞凋亡及其分子机制的初步研究 [J]. *中华血液学杂志*, 1997, 18(1):25-28.
- [60] 宋玲玲,韩冬,林瑞超,等. 矿物药雄黄的研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(3):31-38.
- [61] International Agency for Research on Cancer (IARC). Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018 [EB/OL]. <https://www.iarc.fr/news-events/global-burden-of-cancer-attributable-to-infections-in-2018-a-worldwide-incidence-analysis/>, 2020-4-10/2020-05-01.
- [62] 王涛. 亲水性雄黄纳米制剂的抗肿瘤功效和机理研究 [D]. 北京:北京协和医学院, 2019.

[责任编辑 顾雪竹]