

隐形脂质体的研究进展

王新霞¹, 鲁莹², 胡国², 钟延强² (1. 第二军医大学东方肝胆外科医院药剂科, 上海 200433, 2. 第二军医大学药学院, 上海 200433)

摘要 隐形脂质体, 是近年来为了克服普通脂质体易被网状内皮系统识别吞噬而造成其体内循环时间短的缺陷发展起来的一种特殊类型的脂质体载体系统, 此外, 隐形脂质体还可提高包封率、增强靶向性、降低毒性、提高疗效以及作为免疫载体等特性。本文对隐形脂质体近年来国内外研究进展做一综述。

关键词 隐形脂质体; 免疫载体; 包封率; 毒性; 靶向性

中图分类号: R944

文献标识码: A

文章编号: 1006-0111(2007)04-0203-03

20 世纪 80 年代以来, 人们已认识到利用脂质体作为药物载体, 可以降低药物使用剂量, 减少毒副作用及变态反应, 延长药效, 减少药物在体内的消除速度, 进而提高药效。人为改变某些因素可使药物在体内分布得到控制, 具有药物靶向性, 降低药物毒性等优点。但人们也发现, 脂质体仍存在问题, 例如: 易被网状内皮系统识别后被巨噬细胞吞噬, 这虽然能提高某些药物的安全性, 但在体内作用时间短, 对水溶性药物包封率不高, 且因药物的渗漏容易造成包封率下降, 常规脂质体长期储存易产生聚合等, 所以目前脂质体的研究多立足于提高脂质体的长循环作用和稳定性, 其中对脂质成分进行修饰以提高脂质体的防识别能力的隐形脂质体 (stealth liposome) 的研究最为广泛。下面就其研究进展作一简要综述。

1 提高脂质体的包封率, 降低非特异性吞噬

近年来用聚乙二醇二硬脂酰磷脂酰乙醇胺 (PEG-DSPE) 对脂质体膜进行修饰, 采用化学梯度法制备阿霉素隐形脂质体与普通脂质体作对比, 采用小鼠尾静脉注射方式给药, 证明包封率可提高到 97%, 而普通脂质体包封率仅为 40%~60%; 利用高效毛细管电泳紫外 (HPLC-UV) 法测阿霉素在小鼠体内的血药浓度可知: 药物在心、肺等组织中的分布同游离型注射剂相比, 脂质体的 AUC 值显著减少 ($P < 0.05$), 这显示脂质体被心肺组织摄取量减少, 从而降低了药物的毒性。在肝脾等组织中则被大量摄取, 药物浓度比其它组织高, 但仍比普通型脂质体低, 这反映了其可逃避网状内皮系统 (RES) 的作用, 延长药物体内滞留时间, 所以化学梯度法制备隐形

脂质体包封率高, 延长药效, 在减少被 RES 捕获的同时减少心肺毒性。该类脂质体由于其长循环特性使它相对于普通脂质体在癌区有相对较高的浓度。而且该类型脂质体已成功用于临床, 如盐酸多柔比星脂质体 (Doxil) 是第 1 个得到美国认可的长效循环脂质体。此类药物的活性取决于表面活性物质和制剂工艺^[1]。

2 增强脂质体的靶向性

在众多靶向性抗肿瘤药物制剂研究中, 以隐形脂质体为载体包裹抗肿瘤药物是目前最为有效的方法之一, 其作用不但延长药效而且靶向性明显。如用脂质体包裹白血福 (马利兰 busulfan 又名 L-Bu), 可改变药物的药代动力学特征和药物在体内的分布。体内外试验表明脂质体的平均粒径为 220 nm, 药物含量为 0.31 mg/mL, 体内半衰期 $t_{1/2}$ 为 8.7 d, 与 Bu 游离型相比, 有相对高的骨髓细胞分布浓度 (1.59 : 0.83), 更高的分布体积 (1.39 : 0.87 L/kg), 而且消除半衰期也长于 Bu (血中 2.52 : 1.53; 骨髓中 3.08 : 1.75), 且 L-Bu 在 0.5~3.5 mg/kg 剂量范围内呈线性分布。L-Bu 与 Bu 的 AUC 也显示出不同 (19.93 : 11.82 mg·h/mL) 特性。采用 C^{14} 标记法进行分布性研究发现 L-Bu 在骨髓中放射性活性为普通 Bu 的 3 倍, 在脾中为其 2 倍, 而在心脑中则低于 L-Bu。目前, 这种新型 L-Bu 正处于临床研究阶段, 其意义正是在于对骨髓、脾的靶向性, 且不会在肺等其他重要器官产生毒性^[2]。

3 隐性脂质体载体延长体内循环时间

单层隐性脂质体 (SMLS) 是从多室脂质体 (MLVs) 制备而来, 所用脂质材料为二棕榈酰磷酸卵磷脂 (DPPC)、胆固醇、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺 (DSPE-PEG) 及硬脂酰胺 (stearylamine) (摩尔比 10

作者简介: 王新霞 (1973-), 女, 药师。

通讯作者: 钟延强, E-mail: yqzhong68@163.com

: 5 : 1.4 : 1.4)。二者包封率分别为 6×10^{-6} 和 6×10^{-7} M, 抗生素莫能星 (monensin) 4 个月从脂质体中的渗漏少于 20%, 对莫能星单层隐性脂质体在人血浆中的释放速率研究表明, 其释放半衰期 $t_{1/2}$ 为 10 h, 研究其药动学过程发现给予小鼠 24 h 后, 仍有 20% SMLS 在血循环中, 且 SMLS 能 2 倍提高 HL-60 细胞对阿霉素 (doxorubicin, DXR) 的摄取, 与单纯莫能星相比, 单层隐性脂质体 (SMLS) 可提高 DXR 对 HL-60 细胞和人 LOVO 肿瘤细胞的敏感性 6-10 倍和 200 倍^[3]。此外, 在研究以隐性脂质体为载体的 DXR, 普通脂质体包裹的 DXR 及未包裹脂质体的 DXR, 在针对 murine histocytoma M5076 肿瘤细胞的作用时发现, 隐性脂质体 DXR 包封率在水中为 $(96.5 \pm 0.2)\%$, 在 5% 葡萄糖中为 $(95.5 \pm 0.1)\%$, 在 0.9% 生理盐水中为 $(98.01 \pm 0.5)\%$, 均较高, 且其血浆中浓度高于普通型 DXR, 但仍未克服其较强的毒性反应^[4]。

4 以减轻毒副作用为目的的隐形脂质体^[5,6]

人们在研究抗肿瘤药物中, 肿瘤坏死因子 (TNF- α) 的作用不容忽视, 但如何解决其高毒性的难题一直是人们所困扰, 用其注射剂静脉给药几乎不能被人接受, 只作为隔离肢体灌注治疗恶性黑色素瘤、软组织瘤, 但由于毒性大, 其安全性仍限制其广泛应用, 目前人们用 TNF- α 与苯丙氨酸、干扰素、阿霉素合用以提高疗效, 多层脂质体为载体的 TNF- α 易被单核巨噬细胞所识别, 所以用隐性脂质体为载体, 通过鼠肿瘤模型试验, 观察隔离肢体灌注治疗与系统应用 TNF- α 的疗效发现, 同系因子为非致免疫性且有高度血管活性, 而且两种作用疗效相同, 且隐性脂质体为载体的 TNF- α 毒性明显减弱。

5 提高疗效为目的的隐形脂质体

隐形脂质体包封药物可提高药物疗效。喜树碱三氟酯 [7-[(4-甲基哌嗪)甲基]10, 11-(乙基烯二醇)-(20s), GL147211C] 是一种喜树碱类物质, 为拓扑异构酶抑制剂, 具有抗肿瘤活性, 对人和动物均有效。将其包裹于隐形脂质体内, 其药动学与针对于 HT29 结肠癌异种皮移植细胞抗肿瘤活性表明, 以 GL147211C 长效隐形脂质体制成聚乙二醇修饰的长循环隐形脂质体 SPI-355 与非脂质体载体的喜树碱相比: 当 SPI-355 剂量为 10 mg/kg 时, 药时曲线下最大血药浓度比非脂质体要高 36 ~ 1 250 倍, 抗肿瘤效率比 GL147211C 高 20 倍, 并且完全抑制肿瘤, 具有较好耐受剂量, 比 GL147211C 最大耐受剂量低 5 倍, 其治疗指数高于 GL147211C 5 倍, 但毒

性增大, 体重减轻等副作用仍不容忽视^[7]。研究还发现同样低剂量使用顺氯铂无效时, 若以隐形脂质体为载体, 则显示抗肿瘤效果, 但 90% 的病人出现体重减轻, 并需要 3 ~ 4 周恢复期^[8]。

6 隐形免疫脂质体^[9,10]

随着人们对隐形脂质体长期作用认识的深化, 大多数隐形脂质体只作用于肿瘤细胞外部, 不能被肿瘤细胞接受, 而目前在减少抗肿瘤药毒性、加强其作用的同时, 人们考虑如何将抗体介导与隐形脂质体治疗有机结合提高隐性脂质体的主动靶向性, 于是提出了免疫脂质体的概念, 隐形免疫脂质体 (stealth immunoliposome) 是单克隆抗体修饰的隐形脂质体的简称, 集隐形脂质体的特性和抗体的靶向性于一体, 是一种新型的药物转释系统。具体的说隐形免疫脂质体是利用特殊的隐形脂质材料将单克隆抗体连接在 PEG 长链的远端制备的一种新型靶向脂质体, 该类脂质体多用于包被细胞毒素等大分子药物, 在用单克隆抗体或在肿瘤等特殊细胞株有高度表达的抗体修饰后, 体内可定向与肿瘤组织发生特异性结合释放药物, 达到主动靶向的目的。

隐形免疫脂质体的制备, 包括磷脂的 PEG 化、脂质体的准备以及脂质体的抗体修饰三个过程。Kirpotin D 等^[11,12] 采用下列方法制备免疫隐形脂质体:

6.1 马来酰亚胺-聚乙二醇-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺 (Maleimido-PEG-DSPE) 的合成 1.5 mg 的 NH₂-PEG-DSPE 和 6.2 mg 的 N-琥珀酰亚胺-3-马来酰亚胺丙酸酯 (N-succinimidyl-3-(N-maleimido)-propionate) 溶解在 3 mL 的二氯甲烷和 0.75 μ LDMF 中, 加入 76 μ L 的三乙胺, 反应 15 min 后反应物用溶于氯仿的甲醇 (0% ~ 14%) 从硅凝胶柱梯度洗脱下来。收集氯仿: 甲醇 (88 : 12) 的洗脱产物蒸发、干燥得到白色固体 M-PEG-DSPE。

6.2 脂质体的制备 将 Maleimido-PEG-DSPE 和胆固醇的比例 3 : 2 用薄膜分散法制备, 将干燥脂质膜在 hank's 平衡盐溶液 (HBS) 中振荡, 或在 35mM 8-羟甲基苄三磷酸钠溶液 (HPTS) (pH7.0, 用 NaCl 将渗透压调整到 280 mosm/L) 中, 在室温下用 0.1 μ m 的微孔滤膜多次过滤, 当 HPTS 被葡聚糖凝胶 G 除去后, 脂质体则保留在 4 $^{\circ}$ C 5 mM 磷脂的 N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-甲磺酸缓冲液 (HEPES) 中。

6.3 脂质体的抗体修饰 在 HEPES 缓冲液中, 抗 HER2 抗体 Fab 加入到脂质体溶液中, 浓度为 0.3 mg/mL, 用氢氧化钠将 pH 调节到 7.3 ~ 7.4 后, 混合物在氩气中室温孵育过夜。过量的马来酰胺基团

用2mM的 β -巯基乙醇灭活, β -巯基乙醇和尚未结合的抗体通过琼脂糖凝胶除去(PBS洗脱)。最后用0.2 μ m的滤器滤过,4 $^{\circ}$ C保存。为了制备不同抗体结合量的免疫脂质体,抗HER2抗体Fab与马来酰胺激活的脂质体的最初比例是不同的。

Vaage J等^[8]将脂质体载上erb-2引导的单克隆抗体,利用肿瘤表面erb-2抗原的识别,使其作用准确有效。在研究中,以anti-erb-2Mab两倍连以HZ-PEG-DSPE制备的隐性脂质体,体外细胞毒性实验证实了其靶向性,这种效果也可用于获得其它抗体。作者以裸鼠为对象研究体内分布,抗体脂质体利用PEG-hydrazide表面修饰后毒性减小。而总体上说与其他非抗体脂质体相似,其疗效主要取决于药物向肿瘤细胞的传递,其影响程度取决于脂质体聚积度及外渗过程,与其吸收率和靶向趋向无关。

Tseng YL等^[13]将纯化的单抗S5A8连接到小单层脂质体表面的PEG尾部制成免疫脂质体,该种脂质体包裹阿霉素,用同系的C3H/He小鼠比较了包裹阿霉素的免疫脂质体、包裹阿霉素的非靶向脂质体和阿霉素加空的免疫脂质体的药效。前者与后者相比,延长了循环时间和荷38C13肿瘤细胞小鼠的生存时间。结果显示,免疫脂质体在靶向治疗淋巴瘤组织瘤中有较好的应用前景。Pastorino^[14]报道载阿霉素的隐形免疫脂质体通过与受体结合选择性抑制人成神经细胞瘤的生长代谢,将血管内皮细胞增生标记的氨基肽酶N与阿霉素隐形脂质体交联后的动物试验表明载阿霉素的隐形免疫脂质体可通过抑制肿瘤细胞血管内皮的密度而表现显著的抗肿瘤效果。

除了上述隐形脂质体和免疫脂质体外,普通脂质体的处方学研究也报道较多,如将双肉豆蔻和胆固醇组成的脂质体中加入非离子性表面活性剂,聚山梨酯及加防冻剂等都是为了提高脂质体稳定性、包封率、效价。

总之,近年来对脂质体的研究取得了重大的成绩,随着研究的深入,必将有更多更好的脂质体投入临床。

参考文献:

- [1] 吕万良,齐宪荣. 阿霉素隐型脂质体制成及在小鼠体内的组织分布[J]. 中国药学杂志, 1999, 34(5):310.

- [2] Hassan M, Hassan Z, Nilsson C, et al. Pharmacokinetics and distribution of liposomal busulfan in the rat. A new formulation for intravenous administration[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 1998, 42(6):471.
- [3] Singh M, Ferdous CA, Jackson LT. Stealth monensin liposomes as a potentiator of adriamycin in cancer treatment[J]. J Controlled Release, 1999, 59(1):43.
- [4] Wang JP, Maitani Y. Pharmacokinetic and antitumor effect of doxorubicin carried by stealth and remote loading liposomes[J]. Pharm Res, 2000, 17(7):782.
- [5] Van DV, Alexander M, Timon LM. Stealth liposomal tumor necrosis factor in solid tumor treatment[J]. Int J Pharm, 1998, 162(12):87.
- [6] Timo LM, Alexander M. A rat extremity soft tissue sarcoma model for the study of systemic treatment with Stealth[®] liposome-encapsulated tumor necrosis factor- α and cytotoxic agents[J]. Adv Drug Delivery Rev, 1997, 24(3,2):245.
- [7] Colbern GT, Dykey DJ, Enybers, et al. Encapsulation of the topoisomerase I inhibitor GL147211c in pegylated liposomes: pharmacokinetics and an tumor activity in HT29 colon tumor xenografts[J]. Clin Cancer Res, 1998, 4(12):3077.
- [8] Vaage J, Donovan D, Wipfle E, et al. Therapy of a xenografted human colonic carcinoma using cisplatin or doxorubicin encapsulated in long-circulating pegylated stealth liposome[J]. Int J Cancer, 1999, 80(1):134.
- [9] Park JW, Benz CC, Martin FJ. Future directions of liposome- and immunoliposome-based cancer therapeutics[J]. Semin Oncol, 2004, 31(6 Suppl 13):196.
- [10] Hu R, Davis R, Yao Y, et al. Development of a competitive ELISA for the quantification of F5 conjugate in HER2-targeted stealth immunoliposome doxorubicin in plasma samples[J]. Anal Bioanal Chem, 2006, 386(6):1657.
- [11] Kirpotin D, Park JW, Hong K, et al. Sterically stabilized anti-HER2 immunoliposomes: design and targeting to human breast cancer cell in vitro[J]. Biochemistry, 1997, 36:66.
- [12] Park JW, Hong K, Kirpotin D, et al. Anti-HER2 Immunoliposomes Enhanced Efficacy Attributable to Targeted Delivery[J]. Clinical Cancer Research, 2002, 8:1172.
- [13] Tseng YI, Hung RL, Tao MH, et al. Sterically stabilized antiidiotype immunoliposome improve the therapeutic efficacy of doxorubicin in murine B-cell lymphoma models[J]. Int J Cancer, 1999, 80(5):723.
- [14] Pastorino F, Brignole C, Di Paolo D, et al. Targeting liposomal chemotherapy via both tumor cell-specific and tumor vasculature-specific ligands potentiates therapeutic efficacy[J]. Cancer Res, 2006, 66(20):10073.

收稿日期:2006-09-23

书 讯

《药品法规知识100问》由100个常见的药品管理问题组成,以自问自答的方式阐述《药品管理法》的思想和法律规定,具有较强的科学性和实用性,是一本既便于学习也便于查阅的“袖珍参考书”。全书共71页,定价8.00元,预购者请与本刊编辑部联系。