

• 综 述 •

靶向脂质体的药理学评价

王富喜, 邓宏图 综述, 王 滨[△] 审校

(滨州医学院附属医院药学部, 山东 滨州 256600)

[摘要] 与传统制剂相比, 靶向脂质体成为新药研发的热点, 其可提高药物的选择性, 提高疗效同时减少不良反应, 改善患者的顺应性。针对靶向脂质体进行科学规范的药理学评价, 对保证药物制剂的安全、有效及质量可控具有重要意义。本文综述了靶向脂质体临床前的药理评价, 以靶向脂质体质量研究与控制为参考, 着重阐述靶向脂质体药理学评价的技术和方法。

[关键词] 靶向制剂; 活体荧光成像; 流式细胞术; 综述

DOI: 10. 3969/j. issn. 1009-5519. 2023. 01. 029

中图法分类号: R965

文章编号: 1009-5519(2023)01-0137-04

文献标识码: A

Pharmacological evaluation of targeting liposomesWANG Fuxi, DENG Hongtu, WANG Bin[△]

(Department of Pharmacy, Affiliated Hospital of Binzhou Medical College,
Binzhou, Shandong 256600, China)

[Abstract] Compared with traditional preparations, the targeted liposomes have become a hot spot in the development of new drugs, which can improve the drug selectivity, increase the efficacy, reduce the adverse reactions and improve the patient compliance. Conducting the scientific and standardized pharmacological evaluation on targeted liposomes is of great significance to ensure the safety, efficacy and quality control of pharmaceutical preparations. This paper reviews the preclinical pharmacological evaluation of targeted liposomes. Taking the quality research and control of targeted liposomes as reference, it focuses on the technology and method of pharmacological evaluation of targeted liposomes.

[Key words] Targeted preparations; Intravital fluorescence imaging; Flow cytometry; Review

靶向给药系统是指通过局部给药或经全身血液循环, 由载体对目标组织、细胞或细胞内结构进行选择性的浓集和定位的给药系统。靶向给药能使药物浓度富集于靶标, 从而减少用药剂量, 同时提高药物疗效, 减少不良反应, 还能控制释药速率和方式, 最终达到高效低毒的效应。靶向给药系统可分为脂质体、微囊、微球、纳米粒等, 目前应用最为广泛的为靶向脂质体^[1]。

临床前的药理评价可以为临床研究提供可靠的实验支持, 为临床研究提供有关药物有效性或安全性的重要参数。临床前药理学研究的主要内容包括: (1) 主要药效学研究, 内容包括客观评价受试药的优劣, 并与已上市的、公认的有效药物进行比较后, 经过科学严格的实验设计, 确定取舍; (2) 一般药理学研究, 指对受试药主要药效之外的药物效应进行研究; (3) 作用机制的研究; (4) 临床前药动学的研究, 是研究药物吸收、分布、转化和排泄, 并根据数学模型得出重要的药物动力学参数^[2]。本文首先简要介绍靶向脂质体的分类及理化性质评价, 再从药效学、靶向性、

体外及体内实验评价等全面综述靶向脂质体的药理学评价。

1 靶向脂质体的分类及特点

根据作用机制的不同, 靶向脂质体可分为物理化学靶向、主动及被动脂质体。物理化学靶向脂质体是在脂质体中加入一些特殊的磁性材料, 使脂质体对光、热、pH、磁场等刺激产生反应, 从而使药物直接作用于目标组织, 如磁性、温度敏感型、pH 敏感型靶向脂质体等均属此类^[3]。主动靶向脂质体是指在脂质体表面连接能够与靶蛋白结合的一些糖残基、抗体、激素和受体配体等, 使脂质体主动到达特定的靶器官、靶组织和细胞系后释放药物而发挥药效。被动靶向脂质体是指脂质体通过静脉注射进入机体后易被体内的吞噬细胞吞噬, 形成了天然倾向的富集作用, 其与主动靶向脂质体最大的区别是脂质双分子层没有修饰, 具有特定功能的配体、抗体等^[4]。

此外, 脂质体的关键质量属性包括形态、粒径、包封率、释放度、靶向性等, 其表征方法包括理化性质评

[△] 通信作者, E-mail: 303662296@qq.com.

价和药理学评价^[5]。

2 靶向脂质体的理化性质评价

理化性质评价通常包括粒径大小及分布均匀程度、稳定性及包封率等方面。粒径大小及分布除与其包封率及稳定性有关外,同时对载药脂质体的治疗效果有直接的影响。因物理和生理作用,机体能够选择性地肝、脾、肺、淋巴等部位聚集不同大小的载药脂质体,从而使其释放药物发挥药效。脂质体形态与粒径的检测主要通过 3 种途径:(1)光学显微镜,是最常规的镜检方式,其适于检测粒径较大的脂质体。(2)电子显微镜,是最通用的镜检方式,也是直接测定粒径最准确的方法。(3)激光散射法,又称动态光散射法,能够测定出脂质体样品的平均粒径^[6]。

稳定性是通过检测 Zeta 电位来评价的。Zeta 电位越高,粒子间的斥力越大,体系因不易聚集从而稳定性越强。此外,Zeta 电位高时进入扩散层的反离子较多,吸附层的反离子较少,在胶粒周围会产生水化膜从而稳定性好,因为离子在双电层中具有较强的水化作用^[7]。

包封率一般采用重量包封率表示,其测定时须分离载药脂质体和游离药物。包封率受药物的性质、粒径、药脂比、制备方法等多种因素影响。测定方法包括紫外分光光度法、电子顺磁共振波谱法、核磁共振波谱、高效液相色谱法及液相色谱-质谱联用等方法^[8]。新药研发中,要求脂质体对药物的包封率一般不得低于 80%。

3 靶向脂质体的药理学评价

3.1 靶向脂质体的药效学评价 靶向脂质体的药效学评价是指经过科学、严格的实验,并经过与已上市及公认的经典药物比较,至少在体内及体外 2 种以上的模型上进行实验,从而客观评价新制剂的优劣。脂质体所荷载的药物主要包括抗肿瘤药物、抗生素及抗病毒药物等。近年来,在抗肝损伤、抗动脉粥样硬化、抗类风湿性关节炎、抗脑卒中、抗血栓及抗肿瘤等体内实验研究中,承载常规药物或基因药物的靶向脂质体得到了广泛应用,并表现出了明显的高效、低毒等优良特性。

抗肿瘤药物脂质体是近年来研究的热点之一。抗肿瘤靶向脂质体的体外药效学评价包括 MTT 等方法检测肿瘤细胞的增殖,TUNEL 法检测细胞的凋亡,划痕法检测细胞的迁移,Transwell 法检测细胞的侵袭等。体内药效学评价一般以荷瘤鼠为研究对象,观察实验鼠的生存状态(包括精神状态、自主活动、毛发状态等),记录动物的体重,测量肿瘤的大小及计算肿瘤抑制率,检测血清中的氧化炎症因子及肿瘤标志物,分子生物学手段检测目的基因及目的蛋白的表达等^[9]。

抗生素靶向脂质体的体外药效学评价一般通过 LPS 刺激 RAW264.7 细胞致炎症模型进行,实验检

测体系包括肿瘤坏死因子、白细胞介素、一氧化氮等炎症因子水平的检测及活性氧水平的检测等。体内药效学评价一般采用肝损伤、肺损伤、关节炎等动物模型,肝或肺损伤模型的检测指标包括靶组织损伤特异性标志物的检测、血清炎症及氧化应激因子水平的测定,靶组织病理学检测、目的基因及目的蛋白的表达检测等;关节炎动物模型的检测指标包括关节肿胀度的测定,关节炎指数的测定、血清及关节组织炎症因子水平的测定,关节组织病理学检测等^[10]。

3.2 靶向脂质体的靶向性评价 在靶向制剂的研究过程中,建立良好的靶向评价体系是必不可少的。首先,需要建立可视化的数据或图表支持制剂靶向、并能够精准客观反映靶向性的评价体系;其次,需要为制剂的条件优化提供实验依据。体外实验通常采用细胞摄取实验,将靶向脂质体接上荧光素,再与选定的细胞进行共孵育,一定时间后检测细胞内荧光强度,从而表明制剂的细胞靶向性。体内实验通常采用具体的动物模型,仍然是将靶向脂质体接上荧光素,再将其静脉注射入动物体内,一定时间后检测动物全身各处荧光强度的差异,表明制剂的组织靶向性。

3.2.1 体外评价方法 体外评价内容包括粒径大小、电位、体外释放特性、载药量检测、包封率、体外细胞研究、组织切片技术等。不同类型的靶向制剂最佳的体外评价标准需要根据其本身及靶标的特性以及采用的靶向策略而定。

3.2.1.1 粒径大小 例如,脂质体粒径小于 50 nm 时一般都能够靶向至脾组织;在 50~100 nm 时能靶向至肝组织;在 0.1~0.2 μm 时能够靶向至肝组织肝巨噬细胞的溶酶体;在 7~12 μm 时可被肺组织细胞摄取;>12 μm 时能够被毛细血管上皮细胞摄取而到达荷瘤组织内;>15 μm 时能被肠系膜动脉等血管上皮细胞摄取^[11]。因此,针对制剂不同大小颗粒的滞留性,可根据机体不同组织的生理学特性构建靶向释药制剂,通过观察颗粒大小,可对该类制剂的靶向进行评价。

3.2.1.2 释放度测定 释放度指在一定时间内药物从制剂溶入特定介质中的累计百分率。针对靶向脂质体的释放度测定除了选用常规释放介质外,还需要根据不同疾病特点选用特定介质。某些病变组织常伴有一些物理化学性质的改变,研究指出,肿瘤细胞内通常伴有高热、高酸性、特殊微菌群产生多种酶等特性,因此针对肿瘤通常需要设计出 pH、温度或酶敏感的靶向制剂。此外,物理化学因素敏感的靶向脂质体主要是通过不同组织有不同的释放度这一特点而实现靶向行为;同时还应考虑到,理化因素除了会影响药物扩散速度,还会影响基质材料的降解速度^[4]。

3.2.1.3 体外实验评价 评价靶向脂质体将药物递送至靶细胞,主要是通过检测制剂的细胞摄取率来实现。(1)细胞成像技术是将荧光素与磷脂等进行结合,制备具有荧光标记的靶向脂质体,利用细胞成像等方法检测靶向效果^[12]。(2)激光扫描共聚焦显微镜(confocal laserscanning microscope, CLSM)可用于实时观察细胞水平的药物制剂释放行为。CLSM 原理是对药物在细胞内的相对荧光值进行动态比较。细胞将大分子物质以质膜的方式摄入细胞内,并由此引发一系列连续的过程,如膜小泡的产生、融合及转运等,这是基本且重要的靶向给药系统内化相应靶细胞作用的模式,正因为这种模式,通过 CLSM 可精准地检测靶向脂质体进行细胞的过程,包括方式、速率及程度等^[13-14]。(3)流式细胞术(flow cytometry, FCM)是一种在快速直线流动状态下进行检测或分选单列细胞或生物颗粒的技术,通过流式细胞仪可测定载药靶向脂质体细胞内化相对量^[15]。有研究将配体树枝状聚合物与表柔比星复合,将复合物在 MCF-7 和 C16 细胞(目标细胞)中进行细胞摄取实验,FCM 发现复合物在细胞中的荧光强度显著大于游离多柔比星在细胞中的荧光强度,同时发现复合物在 MCF-7 细胞中的荧光强度要明显低于其在 C16 细胞中的光强,表明通过 FCM 检测靶向制剂可鉴别靶细胞和非靶细胞^[16]。(4)邻位连接技术(proximity ligation assay, PLA)常用来检测肿瘤标志物,灵敏度高、特异性强。PLA 是将寡核苷酸单链分别标记在单克隆抗体等试剂上作为邻位探针,当探针在空间上因识别同一靶蛋白而接近时,寡核苷酸的自由端点被拉近,在一个附加连接寡核苷酸的作用下进行杂交实现邻位连接,连接酶再以连接探针为模板连接探针的辅助核酸序列,从而实现邻位连接。MIRZAVI 等^[17]在体外实验中通过 PLA 检测 HSP90 的抑制剂 TAS-116 对其选择性,结果显示, TAS-116 对 HSP90 具有极高的选择性,能够对 HSP90 发挥明显抑制作用。

3.2.2 体内实验评价 体内评价主要是采用动物实验分析药物在体内的药动学和药效学,方法包括药动学/药效学模型(PK/PD 模型)、成像技术分析等。

3.2.2.1 PK/PD 模型 靶向脂质体的靶向性可通过体内分布直观地评价。一般以小鼠或荷瘤裸鼠为受试对象,按预定的给药途径将靶向脂质体给药后,于不同的时间点处死动物,取血,分离主要组织并匀浆,测定血清或组织中的药物水平,据此绘制血液及不同组织中的药物浓度-时间曲线,进行动力学处理,以同剂量非靶向制剂做对照,评价靶向制剂在动物体内的分布^[18]。通过 PK/PD 模型检测制剂的靶向性可由以下 3 个参数体现:(1)相对摄取率(re),其表示不同制剂对同一组织或细胞的选择性。re 越大(一般

大于 1)代表该制剂对靶组织或细胞的靶向性越好。(2)靶向效率(te),te 越大(一般大于 1)表示该制剂对靶组织或细胞的选择性越好。(3)峰浓度比(Ce),也反映了不同制剂对同一组织或器官的选择性。Ce 越大表示该制剂改变药物分布的能力越强^[19-20]。

3.2.2.2 放射性同位素技术 放射性同位素标记靶向脂质体后,通过实验动物整体自显影或活体动态显影的方式,观察动物体内不同组织、不同时间的药物分布,优点是直观方便,缺点是不宜定量评价分布情况;也可标记载体后制备微粒,给药后,用新制剂的体内变化间接描述药物的体内过程,不同时间处死动物后检测靶组织放射性强度以评价体内过程。此外,还可用放射性同位素标记药物,测定给药后不同时间各靶器官放射强度,优点是灵敏度和重现性均较好^[21-23]。

3.2.2.3 活体荧光成像(Biofluorescence Imaging, BFI)技术 BFI 技术多采用近红外荧光,可用来评估靶向脂质体在体内的靶向性,特点是穿透能力强及图像分辨率高。将靶向制剂上接上荧光标记物后注射到动物体内,再进行实时及原位荧光强度测定。BFI 常用染料包括 AlexaFluor、CY7、DIR 等。研究表明,在关节炎大鼠模型上,通过 BFI 可表征多种肿瘤坏死因子 α 抑制剂(赛妥珠单抗、阿达木单抗等)在其正常组织和炎症组织中的分布^[24]。此外,粒径相同但标记的不同荧光染料的脂质体在动物体内的分布也不同,可通过 BFI 进行荧光强度定量,以此对纳米载体驱动药物在体内的分布进行进一步的确证^[25]。

4 结 论

近年来,主动靶向脂质体研究最为广泛,其不仅能够将药物主动靶向到靶组织从而提高药物的生物利用度,还能够负载诊断试剂在肿瘤等疾病诊断领域发挥独特优势^[26]。但主动靶向脂质体药物与其他脂质体药物一样同样存在着部分缺点,如稳定性不够、包被不同药物的理化性质差别较大、制备工艺难以工业化、包封率及载药量低下等。但目前,主动靶向脂质体种类日益繁多,且新设计的主动靶向脂质体可以同时利用多种靶向功能,如单克隆抗体与长循环脂质体相结合,能够明显增强长循环脂质体的靶向性。靶向脂质体存在很多优点,但目前大部分相关研究仍局限于动物体内药效学及药动学研究,且通过动物模型得到的研究结果并不能完全代表人体的临床实际情况。虽然靶向脂质体应用于临床还有待深入研究,但药理学评价方法的发展和利用将为创制出更多更好的新型靶向脂质体提供有力的技术支撑,使其作为载体在疾病的治疗和诊断中具有更广阔的应用前景。

参考文献

[1] ZAHEDNEZHAD F, SAADAT M, VALIZA-

- DEH H, et al. Liposome and immune system interplay: Challenges and potentials[J]. *J Control Release*, 2019, 305: 194-209.
- [2] 傅春燕, 刘永辉, 曾立, 等. 中药(复方)药代动力学研究进展[J]. *邵阳学院学报: 自然科学版*, 2021, 18(5): 101-108.
- [3] 马丽霞, 余兰. 磁性药物载体在抗肿瘤方面的研究进展[J]. *药学研究*, 2019, 38(4): 225-228.
- [4] 汤洁, 刘仁发, 戴志飞. 多功能脂质体递药系统[J]. *化学进展*, 2018, 30(11): 1669-1680.
- [5] 孙悦, 刘倩, 杨化新. 抗肿瘤类靶向制剂靶向性评价方法研究进展[J]. *中国新药杂志*, 2017, 26(7): 755-763.
- [6] ARREGUI J R, KOVASU S P, BETAGERI G V. Daptomycin proliposomes for oral delivery: formulation, characterization, and in vivo pharmacokinetics [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2018, 19(4): 1802-1809.
- [7] LIMA P, BUTERA A P, CABEÇA L F, et al. Liposome surface modification by phospholipid chemical reactions[J]. *Chem Phys Lipids*, 2021, 237: 105084.
- [8] 刘忠洪, 张梨, 王丽娟, 等. 肺靶向多西他赛脂质体的包封率测定方法研究[J]. *基因组学与应用生物学*, 2018, 37(5): 2276-2281.
- [9] 杨贵兰, 李文军, 王春华. 靶向脂质体的研究进展[J]. *药学研究*, 2020, 39(5): 289-293, 307.
- [10] 祝侠丽, 李玲华, 王莎莎, 等. 近红外光响应性多烯紫杉醇主动靶向脂质体的制备及其体外抗肿瘤活性[J]. *医药导报*, 2021, 40(8): 1094-1099.
- [11] WANG Y. Liposome as a delivery system for the treatment of biofilm-mediated infections[J]. *J Appl Microbiol*, 2021, 131(6): 2626-2639.
- [12] 杨光. 靶向熊果酸脂质体的制备及其体外靶向性研究[J]. *中草药*, 2018, 49(17): 4045-4050.
- [13] 孙丽娜, 余运运, 张婷, 等. 实时活细胞成像技术在药物研究中的应用[J]. *中国新药与临床杂志*, 2018, 31(11): 608-611.
- [14] YANG B, SONG B P, SHANKAR S, et al. Recent advances in liposome formulations for breast cancer therapeutics [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2021, 78(13): 5225-5243.
- [15] 赵华聪, 王永明, 崔季维, 等. 隐丹参酮靶向脂质体的构建及其体外抗脑胶质瘤考察[J]. *药学学报*, 2021, 56(12): 3268-3276.
- [16] 杭海英, 刘春春, 任丹丹. 流式细胞术的发展、应用及前景[J]. *中国生物工程杂志*, 2019, 39(9): 68-83.
- [17] MIRZAVI F, BARATI M, SOLEIMANI A, et al. A review on liposome-based therapeutic approaches against malignant melanoma[J]. *Int J Pharm*, 2021, 599: 120413.
- [18] GORAIN B, AL-DHUBIAB B E, NAIR A, et al. Multivesicular liposome: A lipid-based drug delivery system for efficient drug delivery[J]. *Curr Pharm Des*, 2021, 27(43): 4404-4415.
- [19] 房嫣, 彭倩雯. 药物制剂靶向性评价方法的研究进展[J]. *中国药师*, 2013, 16(8): 1232-1234.
- [20] LA-BECK N M, LIU X, SHMEEDA H, et al. Repurposing amino-bisphosphonates by liposome formulation for a new role in cancer treatment[J]. *Semin Cancer Biol*, 2021, 68: 175-185.
- [21] CHENG X, GAO J, DING Y, et al. Multi-Functional liposome: a powerful theranostic Nano-Platform enhancing photodynamic therapy[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2021, 8(16): e2100876.
- [22] MANSAT M, PICOT M, CHICANNE G, et al. Liposome-based methods to study protein-phosphoinositide interaction[J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 2251: 177-184.
- [23] AJEESHKUMAR K K, ANEESH P A, RAJU N, et al. Advancements in liposome technology: Preparation techniques and applications in food, functional foods, and bioactive delivery: A review [J]. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 2021, 20(2): 1280-1306.
- [24] SINGH M, DEVI S, RANA V S, et al. Delivery of phytochemicals by liposome cargos: recent progress, challenges and opportunities [J]. *J Microencapsul*, 2019, 36(3): 215-235.
- [25] RAYAMAJHI S, MARCHITTO J, NGUYEN T, et al. pH-responsive cationic liposome for endosomal escape mediated drug delivery[J]. *Colloids Surf B: Biointerfaces*, 2020, 188: 110804.
- [26] SONG X, YAN G, QUAN S, et al. MRI-visible liposome-polyethylenimine complexes for DNA delivery: preparation and evaluation[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2019, 83(4): 622-632.

(收稿日期: 2022-02-23 修回日期: 2022-07-19)