

## 功能化脂质体的体内命运:应用与挑战

邹灵辉, 杨旭, 李佶朗, 丁文雅\*, 奉建芳\*

(广西中医药大学药学院, 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心华南分中心, 南宁 530299)

**[摘要]** 功能化脂质体可以改善药物的体内过程进而实现药物的高效递送,主要表现为增强药物吸收、改变药物分布使其富集于靶标处、降低药物消除以延长作用时间等特点,是目前纳米药物研究的热点方向之一,具有广阔的应用前景。查询国家药品监督管理局(NMPA)、美国食品药品监督管理局(FDA)及欧洲药品管理局(EMA)公布的药品信息发现,目前上市的脂质体药物较少,且国内品种以仿制药为主,除聚乙二醇化脂质体外,没有其他功能化脂质体获批上市,说明相对于发表的科研论文及专利,功能化脂质体的临床转化率处于较低水平。基于此,笔者拟查阅近年来国内外功能化脂质体的相关研究案例,梳理功能化脂质体的概念和类别,围绕体内命运探讨其在药物递送中的特点及应用优势,分析其临床转化率低的主要原因有初期研究缺乏临床思维、功能性材料的有效性和安全性问题、体内外评价方法欠佳及放大生产困难等,并提出加强各学科间交叉渗透以提高研究初期实验设计的合理性、着重考察功能性材料修饰密度及材料间相互作用、开发更为准确安全的脂质体体内外示踪技术、综合评价功能化脂质体递药性能、以低成本和简便性为导向的处方组成及制备工艺优化等可能的应对策略,以期功能化脂质体及其他载体类纳米药物的研发提供参考。

**[关键词]** 脂质体; 功能化; 体内外评价; 临床转化; 安全性; 应对策略

**[中图分类号]** R22;R28;G353.11;R94 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)03-0244-10

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20220455 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220429.0945.003.html>

**[网络出版日期]** 2022-04-29 17:00:36

### *In vivo* Fate of Functionalized Liposomes: Applications and Challenges

ZOU Linghui, YANG Xu, LI Jilang, DING Wenya\*, FENG Jianfang\*

(School of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine,

South China Branch of National Engineering Research Center for Manufacturing Technology of

Traditional Chinese Medicine Solid Preparation, Nanning 530299, China)

**[Abstract]** Functionalized liposomes can improve the *in vivo* process of drugs to achieve high-efficiency delivery by enhancing drug absorption, changing drug distribution and reducing the elimination, which is one of the hotspots in nanomedicine research with broad application prospects. However, the drug information published by official websites of National Medical Products Administration (NMPA), the United States Food and Drug Administration (FDA), and the European Medicines Agency (EMA) shows that there are few liposomal products on the market, and the domestic varieties are mainly generic drugs. Excepting for polyethylene glycolized (PEGylated) liposomes, no other functionalized liposomes have been approved for marketing, which indicates that the clinical translation of functionalized liposomes remains at a low level. Therefore, the relevant reports of functionalized liposomes in recent years were reviewed in this paper, their

**[收稿日期]** 2022-03-25

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(82060806);广西中医药大学岐黄高层次人才团队培养项目(2021002);广西科技基地与人才专项(桂科AD20238058)

**[第一作者]** 邹灵辉,在读硕士,从事中药新型给药系统与新制剂研究,E-mail:532543448@qq.com

**[通信作者]** \*丁文雅,博士,副研究员,从事中药及其纳米制剂研究,E-mail:dingwenya666@163.com;

\*奉建芳,博士,教授,从事中药新型给药系统与新制剂、中药民族药新药研究,E-mail:fengjianfang@vip.163.com

application advantages and main challenges in preparation research and development were discussed based on the *in vivo* process, and their low clinical translation mainly because of the insufficient clinical thinking, safety and efficacy of functional materials, inaccurate *in vitro* and *in vivo* analysis methods and difficulty in scaling up production. Meanwhile, the possible strategies such as introducing the concept of clinical multi-function to improve clinical acuity, focusing on examining the modification density of functional materials and the interaction between the modified materials, evaluating the drug delivery performance of functionalized liposomes from multiple perspectives and scenarios, and conducting cost and convenience-oriented formulation composition and preparation process optimization were proposed in order to provide a reference for the development of functionalized liposomes and other carrier-based nanomedicines.

**[Keywords]** liposomes; functionalization; *in vitro* and *in vivo* evaluation; clinical translation; safety; coping strategies

随着纳米技术在药物制剂领域应用研究的深入,纳米药物研发成为目前高效递药研究的热点方向之一<sup>[1-2]</sup>。国家药品监督管理局药品审评中心2021年8月发布的《纳米药物质量控制研究技术指导原则(试行)》将纳米药物分为了药物纳米粒、载体类纳米药物和其他类纳米药物3种类型<sup>[3]</sup>。通过查阅国内外相关报道发现,由于载体材料及形式的选择多样性,纳米药物的研究多集中于载体类纳米药物。脂质体是载体类纳米药物的重要形式,自1965年由BANGHAM等<sup>[4]</sup>提出后受到广泛关注与研究。现阶段研究中,通过在脂质体亲水外层修饰或在亲水内核中负载所需的功能性物质使其在递药过程中具备长循环、靶向性及诊断作用,进而实现脂质体的功能化递药,极大地提升了药物利用效率及临床治疗效果<sup>[5-7]</sup>。脂质体的功能化丰富了药物的应用场景及常见疾病的治疗模式,是脂质体研发创新的重要手段之一,具有广阔的探索空间。

药物的体内过程是评价制剂递药性能的重要参考,药物进入体内后通常会经历吸收、分布及消除等环节,其中消除又包括代谢和排泄<sup>[8]</sup>。功能化脂质体能够高效递药的关键是改善了药物的体内过程,例如提升药物的吸收,或是改变药物的分布使药物聚集在靶标处,或是提升药物稳定性进而减少药物的消除等都是功能化脂质体的应用特点及优势<sup>[9-10]</sup>。然而,通过查询国家药品监督管理局(NMPA)、美国食品药品监督管理局(FDA)、欧洲药品管理局(EMA)公布的药品信息发现,截止到目前仅有约30种脂质体获批上市,且多数为常规型脂质体,功能化脂质体的临床转化率仍处于较低水平,而药物能否成功临床转化与其体内过程息息相关。了解功能化脂质体的体内过程,有助于评估其安全性和有效性,并可进一步确定制剂的优化和设计

方向,扬长避短,对提升其临床转化率有着十分重要的意义。基于此,笔者通过查阅近年来国内外相关研究,拟阐述功能化脂质体的基本概念及其类别,系统归纳其对药物体内过程的影响,针对研究现状分析功能化脂质体研制所面临的主要问题,并提出可能的应对策略。

### 1 功能化脂质体及其类别

脂质体一般是由磷脂和胆固醇构成的双分子层闭合囊泡,在囊泡内水相和双分子层内分别可以负载亲水性和疏水性药物,是载体类纳米药物的重要形式<sup>[11]</sup>。功能化脂质体是指在脂质体亲水外层修饰或在亲水内核中负载所需的功能性物质使其在递药过程中具备长循环、靶向性及诊断作用等功能,可用于疾病的预防、诊断和治疗<sup>[12-13]</sup>。脂质体最早的功能化是通过在脂质体表面修饰亲水聚合物聚乙二醇(PEG)实现的长循环作用,PEG修饰的脂质体又叫PEG化脂质体或隐形脂质体<sup>[14]</sup>。功能化脂质体的另一大类型是配体靶向脂质体,也是现阶段脂质体创新性研究的热点方向,在脂质体上修饰合适的配体(肽、抗体或其片段、核酸适体、小分子等)后,通过配体和受体之间的特异性结合将脂质体靶向递送至受体过表达的病灶处,此时脂质体对健康组织的脱靶效应最小,例如将抗体或其片段化学偶联到脂质体表面形成的免疫脂质体,对靶抗原具有高度特异性<sup>[15]</sup>。此外,多功能脂质体也是功能化脂质体研究的重要类型,多功能脂质体可以克服单一功能脂质体在临床应用中的局限性以满足某些疾病治疗的需要<sup>[16]</sup>。多功能脂质体的制备技术与配体靶向脂质体类似,只是同时引入了多种配体或其他功能性材料,如脂质体表面修饰多种不同类型配体产生的多功能协同靶向作用,配体结合微环境响应的控制释放型脂质体,以及携带靶向配体、

显像剂用于治疗 and 诊断的脂质体等都是多功能的 体现<sup>[17]</sup>。功能化脂质体及其类别见图1。

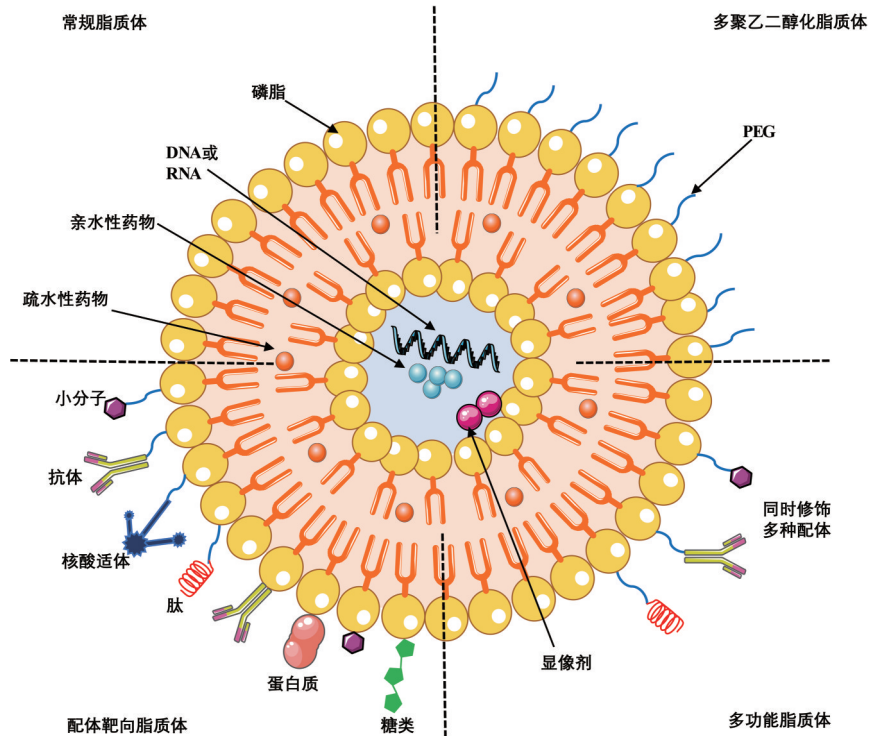


图1 功能化脂质体及其类别示意

Fig. 1 Schematic diagram of functionalized liposomes and their categories

## 2 功能化脂质体的体内过程

功能化脂质体的体内过程也可以看作是机体对其的处置过程,包括药物在机体内的吸收、分布、代谢及排泄,见图2。功能化脂质体可以通过增强药物的溶解性和膜透性来促进药物的吸收<sup>[18]</sup>。药物的体内分布通常与血浆蛋白结合率、组织亲和力、体液pH、药物理化性质及体内屏障有关,功能化脂质体常从以上角度优化设计实现靶向递药<sup>[19]</sup>。代谢和排泄统称为消除,药物过早的被消除会影响药物的吸收与作用时间,功能化脂质体可以延缓药物的消除进而使药物长效化<sup>[20]</sup>。就目前的研究而言,功能化脂质体对药物在体内的各个环节均存在不同程度的影响,可通过修饰特殊的功能性材料来改善药物的体内过程,进而提升药物的治疗效率。

**2.1 PEG化脂质体** 脂质体经静脉注射进入血液后容易被网状内皮系统吸收,调理素将其识别成外来物质后,会促进单核吞噬细胞系统(MPS)对其的吞噬破坏,这是影响脂质体内循环时间的重要原因<sup>[21-22]</sup>。PEG化脂质体是在常规脂质体的基础上引入功能性聚合物PEG制备得到的功能化脂质体,PEG可增加脂质体与血清成分之间的排斥力,产生“隐身功能”,避免脂质体过早的被吞噬破坏进而

延长药物的体内循环时间<sup>[23-24]</sup>。例如,通过乙醇注射法制备得到的PEG化藤黄酸脂质体,其利用PEG产生的隐身特性增加了脂质体在血液循环中的稳定性,减缓了药物在体内的消除,PEG化藤黄酸脂质体的体内半衰期较藤黄酸溶液高出了约2.84倍,大幅增加了药物在体内的作用时间<sup>[25]</sup>。此外,脂质体的包封保护作用和PEG化后增强的稳定性可以减少药物的不良反应,增加药物的吸收,进而提升药物的治疗效果,有报道称PEG化顺铂脂质体较常规脂质体在膀胱癌原位大鼠模型中药效提升了4.8倍且不良反应减少了3.3倍<sup>[26]</sup>。对此可能的解释是药物包载于脂质体内可减少药物在健康组织处泄漏产生的不良反应,同时防止药物过早地被破坏进而提升药物的吸收量,且PEG化脂质体的长循环功能可以增加脂质体因肿瘤组织的高通透性和滞留效应(EPR效应)产生的被动靶向聚集,增强药物的治疗效果并减少药物对非靶组织的不良反应。此外,PEG相较于其他能够产生长循环作用的修饰材料如水合磷酸酰肌醇等,具有生产成本低、扩大生产率高等优势,同时还可以通过改变PEG在脂质体表面的物理化学性质来抑制脂质体相互聚集,进而增强长循环脂质体在复杂生理环境中的稳

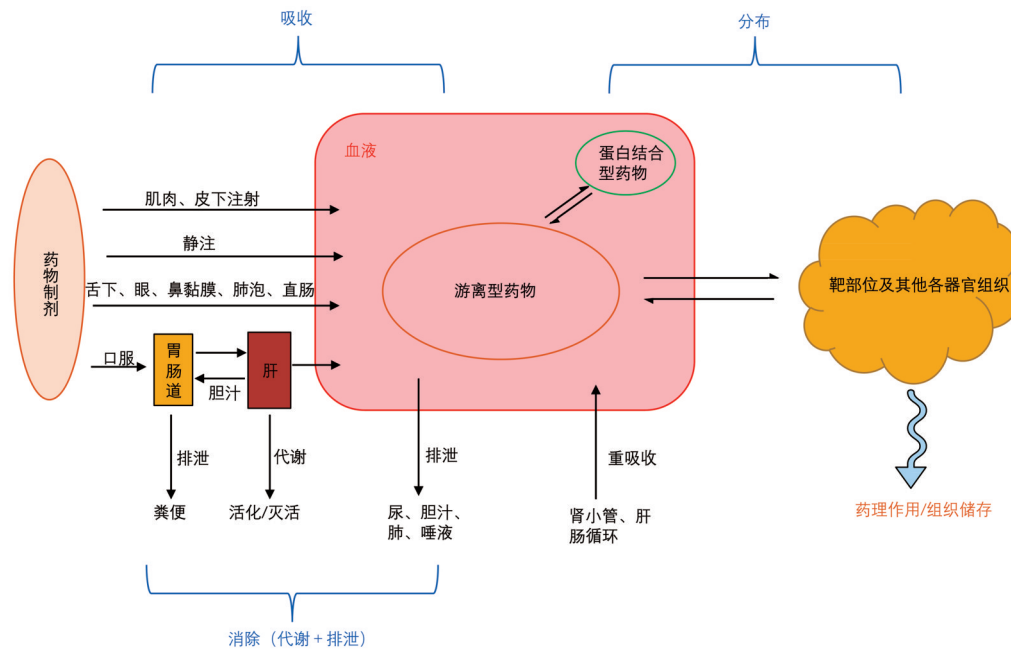


图2 药物制剂的体内过程

Fig. 2 *In vivo* process of various drug preparations

定性<sup>[27-29]</sup>。

**2.2 配体靶向脂质体** 配体靶向脂质体是现阶段功能化脂质体研究的重要领域,其核心机制就是通过配体与受体之间的特异性结合改变药物的体内分布,因此,靶受体和配体的选择尤为重要,理想的靶受体应该是在病灶处过表达而在健康组织几乎不表达或低表达<sup>[30]</sup>。引入合适的配体后可改善药物的体内分布,使药物富集于靶标处,提升药物治疗效果并降低药物对非靶标组织的不良反应<sup>[31]</sup>。相较于EPR效应产生的被动靶向作用,配体靶向脂质体可以通过主动靶向将药物递送至靶标处<sup>[13,32]</sup>。配体可以直接修饰至脂质体表面,也可以与PEG化技术相结合,在长循环作用的基础上通过配体受体间的特异性结合改变药物的体内分布。抗体或抗体片段是配体靶向脂质体最常用的配体之一,因为其对靶受体具有高亲和力和特异性。早期研究多集中在使用完整抗体,但由于抗体的大相对分子质量会使脂质体的粒径受到影响,而抗体片段具有与抗体等效的免疫原性和靶向分布等作用,因此后者现在已成为临床上的首选修饰方式<sup>[33]</sup>。抗原结合片段(Fab)可以与血管内皮细胞和肿瘤细胞上过表达的膜型1基质金属蛋白酶(MT1-MMP)受体特异性结合,有研究利用这一特性构建了Fab修饰的PEG化配体靶向脂质体,PEG化增强了脂质体在复杂体内环境中的稳定性,Fab配体的修饰使该配体型脂质体能够靶向至肿瘤细胞和新生血管,在荷瘤

小鼠模型中表现出更为显著的肿瘤生长抑制作用<sup>[34]</sup>。核酸适体是一类能够特异性地与靶标结合的寡核苷酸序列,可作用于蛋白质、金属离子、小分子化合物及细胞膜表面受体等靶标<sup>[35-36]</sup>。其结合能力可与抗体相当甚至更强,同样表现出低免疫原性且稳定性好,也是配体靶向脂质体优良的配体。有研究先使用核酸适体AraHH036作为配体合成适体-PEG脂质缀合物,再通过薄膜水化法制备得到了配体靶向脂质体,显著增强了脂质体靶向小鼠肿瘤内皮细胞的能力,激光共聚焦成像显示,其相较于常规脂质体在肿瘤处的分布与吸收明显增多,可见经适体修饰后的脂质体更容易富集于靶标处而被吸收<sup>[37]</sup>。

除了抗体片段和核酸适体外,肽和拟肽由于易制备、成本低、抗原性低及酶降解抗性增强等特点也受到了广泛关注<sup>[38]</sup>。如A7R多肽被证实是神经纤毛蛋白-1(NRP-1)的配体<sup>[39]</sup>,可用于调节肿瘤血管化和肿瘤生长相关的细胞内信号转导。A7R-半胱氨酸肽(A7RC)修饰的配体脂质体经吸收后能聚集分布于NRP-1受体过表达的肿瘤血管和癌细胞表面,可实现靶向递送,进而抑制肿瘤生长和血管生成。使用A7RC修饰的脂质体递送一线抗癌药紫杉醇,可以增强肿瘤细胞对药物的摄取,使得更多的紫杉醇积累在肿瘤细胞中,进而导致更强的肿瘤细胞毒性,增强了紫杉醇的抗肿瘤作用<sup>[40]</sup>。此外,肿瘤细胞大量繁殖及细胞表面异常糖基化会导致

凝集素样的受体过表达,使得肿瘤细胞较正常细胞对糖类分子有着更高的亲和力<sup>[41]</sup>。因此,糖类分子也成为了优良的靶向配体。有研究制备了含碳量子点的甘露糖化靶向脂质体,与之前研究不同的是,甘露糖可以直接通过甘露糖分子的醛基与脂质体氨基之间的醛胺反应进入脂质体中,减少了PEG的连接,简化了脂质体的修饰步骤<sup>[42]</sup>。该功能化脂质体可以增强碳量子点的稳定性和荧光强度,表现出良好的肝癌HepG2细胞选择性跟踪和有效标记,其产生机制表现为功能化脂质体上的甘露糖分子特异性识别肿瘤细胞表面过表达的甘露糖受体,使HepG2细胞体外摄取和肿瘤细胞体内吸收该脂质体的能力增强,携带的碳量子点也突出了功能化脂质体在生物成像和诊断方面的应用潜力。随着研究的深入,能够被用作靶向配体的物质越来越多,包括细胞转运受体识别的维生素及靶向转铁蛋白受体的蛋白质等都是优良的脂质体修饰配体<sup>[43]</sup>。

**2.3 多功能脂质体** 脂质体自1960年代问世以来,最初的设计主要是应用于药物的递送,随着相关理论的完善及制剂研究的创新发展,越来越多的制剂工作者将多功能化引入脂质体的载药研究中<sup>[44]</sup>。通过在脂质体表面同时修饰多种配体是多功能脂质体的常见形式,例如,基于核酸的Toll样受体(TLR)配体可通过触发不同的信号通路提供协同活性来增强免疫作用,但TLR在体内吸收过程中容易受到核酸酶的降解和血清蛋白的吸附,降低其免疫作用和靶向能力。为克服核酸酶和血清蛋白的清除作用,将TLR3和TLR9配体同时修饰于脂质体上制备得到双配体脂质体,其稳定的体内过程使TLR能够更好地触发相应的信号通路,使树突状细胞活化成熟及巨噬细胞杀菌效力得到更大幅度的提升<sup>[45]</sup>。还有研究将T7和DA7R双肽同时修饰在负载长春新碱和阿霉素的脂质体上用于治疗脑胶质瘤,该多功能载药脂质体经吸收进入血液循环后,其表面修饰的T7肽与血脑屏障上过表达的转铁蛋白受体结合,使其顺利穿透血脑屏障,随后表面修饰的DA7R肽特异性识别胶质瘤表面过表达的肿瘤血管内皮生长因子受体2,进而将脂质体靶向递送至胶质瘤细胞,相比于单配体修饰脂质体和游离药物显示出了更明显的抗神经胶质瘤作用<sup>[46]</sup>。可见多配体共递送策略可进一步改善载药脂质体的体内过程,不同配体发挥协同作用进而实现药物的靶向递送,可作为多功能脂质体研制的重要参考。

除治疗疾病外,将脂质体结合一系列具有不同

理化特性的显像剂可以使脂质体兼具诊断疾病的作用,实现脂质体的临床多功能。例如,同时将多柔比星和核磁共振显像剂Magnevist同时包载于脂质体内,并在表面涂布透明质酸-神经酰胺可以实现脂质体包括诊断和治疗的临床多功能。和游离的多柔比星及未经修饰的脂质体比较,该临床多功能脂质体体内清除率最低,透明质酸和肿瘤细胞表面过表达的白细胞分化抗原44(CD44)受体间的特异性结合增强了脂质体对肿瘤细胞的靶向性,增加了肿瘤细胞对多柔比星的摄取,脂质体内负载的显像剂也使其可以作为肿瘤靶向核磁共振探针用于癌症诊断<sup>[47]</sup>。此外,根据载体材料和功能性材料的不同特性,多功能脂质体还可以被设计成体内微环境响应型脂质体,也称刺激响应型脂质体。与传统的脂质体比较,刺激响应型脂质体对目标病理区域特征的局部条件变化反应灵敏,使脂质体能够在目标部位释放药物进而实现靶向给药。设计微环境响应型脂质体时,常用的外部刺激主要有pH、酶水平、温度、电位改变和外部磁场等。有研究通过在PEG化脂质体表面修饰热敏性聚[2-(2-乙氧基)乙氧基乙烯基醚]链、单抗赫赛汀(HER)并负载用于近红外荧光成像的吲哚菁绿制备得到了三重功能化脂质体。当达到脂质体膜失稳的临界温度时,该多功能脂质体表面修饰的热敏性材料可触发脂质体的释药。HER修饰和热敏刺激释药使该多功能脂质体对过表达HER受体的肿瘤细胞表现出优异的结合和内化能力,根据吲哚菁绿近红外荧光成像判断该脂质体分布在肿瘤部位的时间>48 h,表现出长效化作用<sup>[48]</sup>。由此可见,具备靶点特异性结合、温度触发释药和成像作用的多功能脂质体在疾病的诊断和治疗上有着极大的应用潜力。

### 3 面临的挑战及应对策略

功能化脂质体研究的最终目标是实现临床转化并应用于人类疾病的治疗,查询NMPA、FDA、EMA的药品发布信息发现成功上市的功能化脂质体极少,且均为PEG化脂质体,相较于已经发表的科研论文及专利,临床转化率仍处于较低水平。因此,临床转化率低是目前功能化脂质体研究面临的巨大挑战,笔者拟通过将部分获批上市的原研脂质体与目前的研究进行比较分析,归纳现阶段功能化脂质体临床转化率低的主要原因,提出可能的应对策略。同时,根据不同载药归纳了部分获批上市的脂质体,见增强出版附加材料。

#### 3.1 初期研究缺乏临床思维 脂质体的功能化研

究在一定程度上能够增加脂质体的临床应用潜力。但目前大多数研究过分重视“功能”而忽视对于临床用药所必需的安全性。许多研究不以临床应用为导向,专注于将各种各样的载体材料和修饰技术结合以实现尽可能多的功能,对各功能性载体材料的体内安全性及载体材料之间的相互影响缺乏考察。早在2003年,游离叶酸就被报道过会抑制血浆清除进而对脂质体的体内循环时间产生不良影响<sup>[49]</sup>,但在之后大多数的叶酸配体型脂质体研究中却少有针对该方面的考察和讨论。对此可以引入“临床多功能性”的评价方式让研究者的重心从“为了多功能而多功能”转向临床相关的多功能<sup>[50]</sup>。如2018年获批的丁胺卡那霉素脂质体 Arikayce™,其脂质体成分为二棕榈酰磷脂酰胆碱和胆固醇,没有过多的载体材料和表面修饰,但同样降低了药物不良反应,增强了药物对肺部疾病的疗效,实现了临床意义上的多功能性,简单且有效的制剂设计很大程度提高了药物的临床转化率。同时,实验室层面的研究设计脱离了临床实际需求,如有的抗肿瘤脂质体研究中为了解决 MPS 吞噬纳米颗粒影响药效这一困扰,使用空载脂质体使 MPS 达到饱和或者消耗巨噬细胞<sup>[51]</sup>,这一解决方案对临床应用并不具备参考意义,从临床角度来看其风险远大于收益。故应在实验设计及解决技术问题提高临床敏锐度,减少解决方案的潜在风险,在实验条件允许情况下尽可能模拟接近人类疾病药物治疗的场景,此外,科研人员应加强临床相关基础知识的学习,或者在实验设计初期咨询专业临床医生以确保实验的临床相关性,以解决临床问题为目的而进行研究。

**3.2 功能性材料的有效性和安全性问题** 目前对 PEG 化脂质体的研究大多将重点放在其“隐身特性”方面,缺乏对修饰在脂质体表面的 PEG 链的系统考察。对于不同的载药脂质体,修饰在脂质体上的 PEG 长度和密度对 PEG 化脂质体是否能产生最佳的“隐身功能”至关重要,也是其在体内能发挥效用的关键。已有研究指出 PEG 的最佳负载量为 PEG2000 的 5%~9%(以摩尔计数),此时形成的聚合物链呈现蘑菇球状结构,彼此微弱重叠,完全覆盖在脂质体表面以防止调理素激活吞噬<sup>[52-53]</sup>。高于此范围,虽然表面覆盖完全,但 PEG 密度过高产生的横向排斥会使脂质双分子层不稳定<sup>[54]</sup>。因此,在 PEG 化脂质体的研究中需要阐明用于修饰脂质体的 PEG 长度和密度,对于最佳修饰用 PEG 长度和密度的筛选是日后 PEG 化脂质体优化研究的重点之

一。此外,多功能脂质体的研究中也存在类似问题,多功能脂质体丰富了脂质体的应用场景及疾病的诊治手段,但研究中同样需要特别注意引入的各功能材料之间的相互作用,注重配体密度的考察。功能性材料间的相互作用和过高的配体密度会导致脂质体间的聚集,进而影响脂质体的体内有效性<sup>[55]</sup>。同时,过多的功能性材料引入往往会影响脂质体的粒径大小、形状及表面电荷,已有研究指出粒径过小的脂质体其配体-受体相互作用弱,形状如杆、球体、圆柱体的脂质体能更好地被细胞摄取,对于多功能脂质体的表征要详尽,在保证脂质体能稳定发挥作用的前提下,引入功能性材料,并根据其性质对可能产生影响的方面进行针对性考察<sup>[56-57]</sup>。

功能化脂质体大多通过在载体材料中引入功能性的高分子聚合物来改善药物的体内过程<sup>[58]</sup>。在进入体内后,其存在载药脂质体、游离药物、修饰了功能性高分子聚合物的空载脂质体及代谢产物等多种形态成分<sup>[3,59]</sup>。其中高分子聚合物在体内清除慢,其与机体之间的相互作用增加了功能化脂质体的潜在毒性,如 PEG 化脂质体的修饰材料 PEG 虽具有良好的生物相容性,但也被报道会产生较多的免疫反应,如 PEG 化脂质体重复给药后的快速清除,称为血液加速清除现象,还有补体激活相关的假性过敏等都会影响脂质体的安全性<sup>[60-61]</sup>。此外,载体材料的代谢也会产生潜在毒性,如聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)已被 EMA 和 FDA 批准用于药物和医疗器械,但其在体内水解产生的乳酸可降低周围环境的 pH 并引起炎症组织反应<sup>[3,62]</sup>。因此,功能化脂质体载体材料的选择和修饰应严格按照新药审批的安全要求对功能性材料进行全面的体内过程研究,杜绝使用已被报道过存在严重不良反应的载体材料,尽可能简化功能性材料的修饰手段。

**3.3 体内外评价方法欠佳** 功能化脂质体进入体内后存在载药脂质体、游离型药物、载体材料等不同形态,并且受体内复杂性及脂质体尺寸小的影响,要做到药物的体内实时监测十分困难<sup>[63]</sup>。此外,功能化脂质体自身及其代谢产物相对分子质量呈现多分散性,体内定量也存在一定难度<sup>[64-65]</sup>。目前大多研究是通过采用荧光等放射性物质标记载药脂质体进行分析,但这只能算是定性分析且不一定能准确反映药物的体内真实情况,因为标记物的存在是否会影响载药脂质体的体内过程尚不清楚,说明针对不同形态建立准确的分析方法是功能化脂质体临床转化需要克服的重大难题。对此,在使

用标记法进行药物的体内分析时,可以通过系统的体外试验验证标记物对脂质体的影响,模拟体内环境下标记物是否会提前脱落或被代谢以确保体内分析的准确性。另一方面,大多数研究对功能化脂质体的作用评价不够全面,影响了功能化脂质体的进一步开发,如有研究发现HER抗体靶向免疫脂质体和未修饰脂质体尽管在体内具有相似的肿瘤生物分布,但对分解的肿瘤细胞进行体外流式细胞术分析显示,免疫脂质体的肿瘤细胞积累相较于非配体靶向脂质体约高出6倍,从细胞摄取角度体现出了免疫脂质体的递药优势<sup>[66]</sup>。因此,治疗效果的评价方式需要更加全面,除了对药物组织分布的研究,最好能综合体内肿瘤细胞对药物的吸收情况来评价制剂的递药效果。同时,有研究指出并不是所有肿瘤模型都适用于配体靶向脂质体治疗效果的评价,例如,针对纤维癌抗原的免疫脂质体是否能成功递药与肿瘤的发展阶段有关,免疫脂质体的药物递送效果只在纤维癌肿瘤细胞微转移时期优于未经修饰的脂质体<sup>[67]</sup>。此外,当体内外模型因客观因素存在差异时,功能化脂质体体外评价的结果是否能够准确反映药物的体内情况还有待考究。例如,体外血脑屏障模型可作为功能化脂质体治疗脑部疾病的评价模型,由人脑内皮细胞系与星形胶质细胞、周细胞等支持细胞共培养形成,但其紧密连接和表面受体的表达会随培养条件的变化而不够稳定,与真实的体内情况存在差异,导致体外“有效”的功能化脂质体应用于体内时效果不明显<sup>[68-69]</sup>。因此,研究过程中用于评价脂质体治疗效果的癌症模型需要仔细考察各项影响因素后构建,尽可能选择稳定的体外评价模型,从不同角度评价和设计药物以提高药物疗效并获得一致性结论。

**3.4 放大生产困难** 功能化脂质体放大生产困难一方面是由于脂质体本身的制备工艺并不是都适用于大规模生产,如薄膜分散法、反相蒸发法、复乳法和溶剂注入法等<sup>[70]</sup>目前仅适用于小规模生产,大规模生产时可能会出现粒径分布不均、批次间重复性差、生产成本低和有机溶剂残留等问题。科研工作者也进行过许多尝试,如为了解决粒径分布不均问题而开发出的连续高压均质装置,以期应用于大规模生产包载质粒DNA的脂质体,但在高压作用下药物泄漏严重,同时由于复杂的生产工艺和高昂的生产成本,此方法在大规模生产中的应用并不顺利<sup>[71-73]</sup>。另一方面,步骤繁琐也是功能化脂质体放大生产困难的重要原因。尤其是多功能脂质体,功

能性载体材料的性质多样导致放大生产需要兼顾更多的工艺参数,大幅增加了制备工艺优化的难度<sup>[74-75]</sup>。并且功能性材料大多价格昂贵,较高的成本也是功能化脂质体放大生产困难的重要原因之一。对此,可以在保证治疗效果的同时减少非必要功能化载体材料的引入,或者对现有制备工艺进行适当改进,如采用微流体法制备包裹硫酸铵的PEG化脂质体空壳,再将多柔比星主动负载于这些预先形成的脂质体空壳中,该方法制备的负载多柔比星的功能化脂质体可以克服基于多容器和批处理技术的繁琐性<sup>[76]</sup>。此外,微流体速度也不影响该脂质体产品的特性,因此在该脂质体的放大生产过程中允许高速度,且采用该方法大批量制备的脂质体与上市产品的释药曲线一致,这是一次对功能化脂质体制备工艺优化的成功尝试,同时也能为功能化脂质体的放大生产提供参考。

#### 4 总结与展望

功能化脂质体以其独特的体内过程实现了高效递药的需求,随着相关理论及制剂技术的完善,功能化脂质体的研究从最初的PEG化脂质体延伸至现如今能够用于诊治的多功能脂质体,其研究进展是可喜的,但功能化脂质体的临床转化率仍处于较低水平,这可能与初期研究缺乏临床思维、功能性材料的有效性和安全性问题、体内外评价方法欠佳及放大生产困难等有关。笔者认为,功能化脂质体后续研究应加强各学科间的交叉融合,尤其应重视材料学、生物医学工程、免疫学及临床医学等学科对初期实验设计的理论指导,在进行修饰前应系统考察功能性修饰材料的基础理化性质及其体内过程,确保修饰性材料在安全的基础上发挥功能化递药的作用,多角度、多场景综合评价功能化脂质体的递药性能,开发更为安全准确的脂质体示踪技术用于体内外分析,并且以低成本和简便性为导向尝试功能化脂质体的处方组成及制备工艺优化,克服现阶段大规模生产中多容器、批处理的繁琐性,进而促进载体类纳米药物的发展进程。

#### [参考文献]

- [1] 李翀,吴俊伟. 智能响应药物递送技术的开发与前沿进展[J]. 药学进展,2021,45(5):321-324.
- [2] HE Y Q, XU Z Q, QIU Z W, et al. Evaluation of the efficacy and performance of a new nano-drug carrier in the treatment of recurrent oral ulcerper[J]. J Nanosci Nanotechnol,2021,21(2):1107-1117.
- [3] 付淑军,黄芳华,顾景凯,等. 纳米药物非临床药代动

- 力学研究策略及关注要点[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2021, 26(8): 842-850.
- [ 4 ] BANGHAM A D, STANDISH M M, WATKINS J C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids[J]. J Mol Biol, 1965, 13(1): 238-252.
- [ 5 ] TORCHILIN V P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers [J]. Nat Rev Drug Discov, 2005, 4(2): 145-160.
- [ 6 ] 王凤玉, 张保献, 张广平, 等. 盐酸常山碱的理化性质及其脂质体包封率的测定方法考察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(1): 177-182.
- [ 7 ] ZHANG J, TANG H, LIU Z F, et al. Effects of major parameters of nanoparticles on their physical and chemical properties and recent application of nanodrug delivery system in targeted chemotherapy [J]. Int J Nanomed, 2017, 12: 8483-8493.
- [ 8 ] PAWAR V K, SINGH Y, MEHER J G, et al. Engineered nanocrystal technology: *In vivo* fate, targeting and applications in drug delivery [J]. J Control Release, 2014, 183: 51-66.
- [ 9 ] SERCOMBE L, VEERATI T, MOHEIMANI F, et al. Advances and challenges of liposome assisted drug delivery[J]. Front Pharmacol, 2015, 6: 286.
- [ 10 ] LIM S B, BANERJEE A, ÖNYÜKSEL H. Improvement of drug safety by the use of lipid-based nanocarriers [J]. J Control Release, 2012, 163(1): 34-45.
- [ 11 ] ANTONIETTI M, FORSTER S. Vesicles and liposomes: A self-assembly principle beyond lipids[J]. Adv Mater, 2003, 15(16): 1323-1333.
- [ 12 ] CADDEO C, PUCCI L, GABRIELE M, et al. Stability, biocompatibility and antioxidant activity of PEG-modified liposomes containing resveratrol[J]. Int J Pharm, 2018, 538(1/2): 40-47.
- [ 13 ] BELFIORE L, SAUNDERS D N, RANSON M, et al. Towards clinical translation of ligand-functionalized liposomes in targeted cancer therapy: Challenges and opportunities[J]. J Control Release, 2018, 277: 1-13.
- [ 14 ] IMMORDINO M L, DOSIO F, CATTEL L. Stealth liposomes: Review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential [J]. Int J Nanomedicine, 2006, 1(3): 297-315.
- [ 15 ] FORSSEN E, WILLIS M. Ligand-targeted liposomes [J]. Adv Drug Delivery Rev, 1998, 29(3): 249-271.
- [ 16 ] 安学勤. 刺激响应脂质体及其在控制释药中的应用 [J]. 中国科学: 化学, 2015, 45(4): 340-349.
- [ 17 ] LI M Y, DU C Y, GUO N, et al. Composition design and medical application of liposomes [J]. Eur J Med Chem, 2019, 164: 640-653.
- [ 18 ] DAEIHAMED M, DADASHZADEH S, HAERI A, et al. Potential of liposomes for enhancement of oral drug absorption [J]. Curr Drug Deliv, 2017, 14(2): 289-303.
- [ 19 ] ZHAO Z M, UKIDVE A, KRISHNAN V, et al. Effect of physicochemical and surface properties on *in vivo* fate of drug nanocarriers[J]. Adv Drug Delivery Rev, 2019, 143: 3-21.
- [ 20 ] LIN J H, LU A Y H. Role of pharmacokinetics and metabolism in drug discovery and development [J]. Pharmacol Rev, 1997, 49(4): 403-449.
- [ 21 ] GIULIMONDI F, VULPIS E, DIGIACOMO L, et al. Opsonin-deficient nucleoproteic corona endows unPEGylated liposomes with stealth properties *in vivo* [J]. ACS Nano, 2022, 16(2): 2088-2100.
- [ 22 ] CULLIS P R, CHONN A, SEMPLE S C. Interactions of liposomes and lipid-based carrier systems with blood proteins: Relation to clearance behaviour *in vivo* [J]. Adv Drug Delivery Rev, 1998, 32(1/2): 3-17.
- [ 23 ] DING N, WANG Y, WANG X, et al. Improving plasma stability and antitumor effect of gemcitabine via PEGylated liposome prepared by active drug loading [J]. J Drug Delivery Sci Technol, 2020, 57: 101538.
- [ 24 ] IBARAKI H, TAKEDA A, ARIMA N, et al. *In vivo* fluorescence imaging of passive inflammation site accumulation of liposomes via intravenous administration focused on their surface charge and PEG modification [J]. Pharmaceutics, 2021, 13(1): 104.
- [ 25 ] TANG X Z, SUN J, GE T, et al. PEGylated liposomes as delivery systems for gambogic acid: Characterization and *in vitro/in vivo* evaluation [J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2018, 172: 26-36.
- [ 26 ] GHAFERI M, ASADOLLAHZADEH M J, AKBARZADEH A, et al. Enhanced efficacy of PEGylated liposomal cisplatin: *In vitro* and *in vivo* evaluation[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(2): 559.
- [ 27 ] KULKARNI S B, BETAGERI G V, SINGH M. Factors affecting microencapsulation of drugs in liposomes[J]. J Microencapsul, 1995, 12(3): 229-246.
- [ 28 ] NAG O K, AWASTHI V. Surface engineering of liposomes for stealth behavior [J]. Pharmaceutics, 2013, 5(4): 542-569.
- [ 29 ] REN H W, HE Y W, LIANG J M, et al. Role of liposome size, surface charge, and PEGylation on rheumatoid arthritis targeting therapy [J]. ACS Appl

- Mater Interfaces, 2019, 11(22):20304-20315.
- [30] SUDIMACK J, LEE R J. Targeted drug delivery via the folate receptor[J]. *Adv Drug Delivery Rev*, 2000, 41(2):147-162.
- [31] 朱坤, 杨中澜, 张晓青, 等. 核酸适配体介导脂质体靶向递送抗肿瘤药物的研究现状[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(20):206-212.
- [32] CARACCILO G. Liposome-protein corona in a physiological environment: Challenges and opportunities for targeted delivery of nanomedicines [J]. *Nanomedicine*, 2015, 11(3):543-557.
- [33] GAO J, CHEN H W, SONG H, et al. Antibody-targeted immunoliposomes for cancer treatment [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2013, 13(14):2026-2035.
- [34] HATAKEYAMA H, AKITA H, ISHIDA E, et al. Tumor targeting of doxorubicin by anti-MT1-MMP antibody-modified PEG liposomes [J]. *Int J Pharm*, 2007, 342(1/2):194-200.
- [35] 刘腾飞, 杨代凤, 邓金花, 等. 核酸适配体的筛选制备及分析应用[J]. *生物技术通报*, 2013, 29(4):39-48.
- [36] FAMULOK M, HARTIG J S, MAYER G. Functional aptamers and aptazymes in biotechnology, diagnostics, and therapy[J]. *Chem Rev*, 2007, 107(9):3715-3743.
- [37] ARA M N, MATSUDA T, HYODO M, et al. Construction of an aptamer modified liposomal system targeted to tumor endothelial cells [J]. *Biol Pharm Bull*, 2014, 37(11):1742-1749.
- [38] SUN Y, KANG C, LIU F, et al. RGD peptide-based target drug delivery of doxorubicin nanomedicine [J]. *Drug Dev Res*, 2017, 78(6):283-291.
- [39] STARZEC A, LADAM P, VASSY R, et al. Structure-function analysis of the antiangiogenic ATWLPPR peptide inhibiting VEGF165 binding to neuropilin-1 and molecular dynamics simulations of the ATWLPPR/neuropilin-1 complex [J]. *Peptides*, 2007, 28(12):2397-2402.
- [40] CAO J Y, WANG R, GAO N, et al. A7RC peptide modified paclitaxel liposomes dually target breast cancer [J]. *Biomater Sci*, 2015, 3(12):1545-1554.
- [41] CHOI Y, KIM J, CHAE J, et al. Surface glycan targeting for cancer nano-immunotherapy [J]. *J Control Release*, 2022, 342:321-336.
- [42] GUAN C, ZHAO Y Y, HOU Y T, et al. Glycosylated liposomes loading carbon dots for targeted recognition to HepG2 cells [J]. *Talanta*, 2018, 182:314-323.
- [43] KHAN A A, ALLEMAILEM K S, ALMATROODI S A, et al. Recent strategies towards the surface modification of liposomes: An innovative approach for different clinical applications [J]. *3 Biotech*, 2020, 10(4):163.
- [44] PALEOS C M, TZIVELEKA L A, SIDERATOU Z, et al. Gene delivery using functional dendritic polymers [J]. *Expert Opin Drug Delivery*, 2009, 6(1):27-38.
- [45] BAYYURT B, TINCER G, ALMACIOGLU K, et al. Encapsulation of two different TLR ligands into liposomes confer protective immunity and prevent tumor development [J]. *J Control Release*, 2017, 247:134-144.
- [46] ZHANG Y, ZHAI M F, CHEN Z J, et al. Dual-modified liposome codelivery of doxorubicin and vincristine improve targeting and therapeutic efficacy of glioma [J]. *Drug Delivery*, 2017, 24(1):1045-1055.
- [47] PARK J H, CHO H J, YOON H Y, et al. Hyaluronic acid derivative-coated nanohybrid liposomes for cancer imaging and drug delivery [J]. *J Control Release*, 2014, 174:98-108.
- [48] KONO K, TAKASHIMA M, YUBA E, et al. Multifunctional liposomes having target specificity, temperature-triggered release, and near-infrared fluorescence imaging for tumor-specific chemotherapy [J]. *J Control Release*, 2015, 216:69-77.
- [49] GABIZON A, HOROWITZ A T, GOREN D, et al. *In vivo* fate of folate-targeted polyethylene-glycol liposomes in tumor-bearing mice [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(17):6551-6559.
- [50] GUIDOLIN K, ZHENG G. Nanomedicines lost in translation [J]. *ACS Nano*, 2019, 13(12):13620-13626.
- [51] SUN X L, YAN X F, JACOBSON O, et al. Improved tumor uptake by optimizing liposome based RES blockade strategy [J]. *Theranostics*, 2017, 7(2):319-328.
- [52] BARENHOLZ Y. Liposome application: Problems and prospects [J]. *Curr Opin Colloid Interface Sci*, 2001, 6(1):66-77.
- [53] MOGHIMI S M, SZE BENI J. Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: Critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties [J]. *Prog Lipid Res*, 2003, 42(6):463-478.
- [54] TIROSH O, BARENHOLZ Y, KATZHENDLER J, et al. Hydration of polyethylene glycol-grafted liposomes [J]. *Biophys J*, 1998, 74(3):1371-1379.
- [55] LEE S H, SATO Y, HYODO M, et al. Topology of surface ligands on liposomes: Characterization based on the terms, incorporation ratio, surface anchor density, and reaction yield [J]. *Biol Pharm Bull*, 2016,

- 39(12):1983-1994.
- [56] VERMA A, STELLACCI F. Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions[J]. *Small*, 2010,6(1):12-21.
- [57] ALBANESE A, TANG P S, CHAN W C W. The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems[J]. *Annu Rev Biomed Eng*, 2012, 14:1-16.
- [58] 马玉花, 方玉, 保怡, 等. 药物-脂质共轭物研究进展[J]. *药学学报*, 2020, 55(10):2281-2290.
- [59] TONG X Q, PAN W H, SU T, et al. Recent advances in natural polymer-based drug delivery systems [J]. *React Funct Polym*, 2020, 148: 104501.
- [60] MCSWEENEY M D, VERSFELD Z C, CARPENTER D M, et al. Physician awareness of immune responses to polyethylene glycol-drug conjugates[J]. *Clin Transl Sci*, 2018, 11(2):162-165.
- [61] SCHELLEKENS H, HENNINK W E, BRINKS V. The immunogenicity of polyethylene glycol: Facts and fiction[J]. *Pharm Res*, 2013, 30(7):1729-1734.
- [62] MOHAMED M, LILA A S A, SHIMIZU T, et al. PEGylated liposomes: Immunological responses [J]. *Sci Technol Adv Mater*, 2019, 20(1):710-724.
- [63] WANG B, ZHANG Y B, ZHANG L. Recent progress on micro-and nano-robots: Towards *in vivo* tracking and localization[J]. *Quant Imaging Med Surg*, 2018, 8(5):461-479.
- [64] PALCHETTI S, COLAPICCHIONI V, DIGIACOMO L, et al. The protein corona of circulating PEGylated liposomes[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1858(2):189-196.
- [65] 官娟, 陆伟跃, 占昌友. 血浆蛋白对脂质体内性能的调控[J]. *药学学报*, 2019, 54(12):2240-2250.
- [66] KIRPOTIN D B, DRUMMOND D C, SHAO Y, et al. Antibody targeting of long-circulating lipidic nanoparticles does not increase tumor localization but does increase internalization in animal models [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(13):6732-6740.
- [67] EMANUEL N, KEDAR E, BOLOTIN E M, et al. Targeted delivery of doxorubicin via sterically stabilized immunoliposomes: Pharmacokinetics and biodistribution in tumor-bearing mice[J]. *Pharm Res*, 1996, 13(6):861-868.
- [68] BHALERAO A, SIVANDZADE F, ARCHIE S R, et al. *In vitro* modeling of the neurovascular unit: Advances in the field[J]. *Fluids Barriers CNS*, 2020, 17(1):22.
- [69] CANFIELD S G, STEBBINS M J, MORALES B S, et al. An isogenic blood-brain barrier model comprising brain endothelial cells, astrocytes, and neurons derived from human induced pluripotent stem cells [J]. *J Neurochem*, 2017, 140(6):874-888.
- [70] PATIL Y P, JADHAV S. Novel methods for liposome preparation[J]. *Chem Phys Lipids*, 2014, 177:8-18.
- [71] SHUKLA D, CHAKRABORTY S, SINGH S, et al. Lipid-based oral multiparticulate formulations-advantages, technological advances and industrial applications[J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2011, 8(2):207-224.
- [72] SCHNEIDER T, SACHSE A, RÖBLING G, et al. Large-scale production of liposomes of defined size by a new continuous high pressure extrusion device[J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 1994, 20(18):2787-2807.
- [73] PUPO E, PADRÓN A, SANTANA E, et al. Preparation of plasmid DNA-containing liposomes using a high-pressure homogenization-extrusion technique [J]. *J Control Release*, 2005, 104(2):379-396.
- [74] WANG Y N, WANG C H, LI K Y, et al. Recent advances of nanomedicine-based strategies in diabetes and complications management: Diagnostics, monitoring, and therapeutics [J]. *J Control Release*, 2021, 330:618-640.
- [75] FILIPCZAK N, PAN J Y, YALAMARTY S S K, et al. Recent advancements in liposome technology[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2020, 156:4-22.
- [76] ROCES C B, PORT E C, DASKALAKIS N N, et al. Rapid scale-up and production of active-loaded PEGylated liposomes [J]. *Int J Pharm*, 2020, 586:119566.

[责任编辑 刘德文]