

多功能纳米载体

邢磊^{1,2}, 金义光^{1,2}, 杜丽娜¹

(1. 军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京 100850 2. 河南大学药学院, 河南 开封 475004)

摘要: 目前所用药物纳米载体(如脂质体、胶束、纳米乳、聚合物纳米粒)有很多有益特性,如血液循环时间延长,使药物在病灶聚集;靶向作用;增强细胞内渗透作用;体内载体造影;生理环境敏感的药物释放。但多功能纳米载体仍很少,如长循环免疫脂质体。多功能药物纳米载体可显著增强许多治疗和诊断试剂的效果。本文论述了多功能纳米载体的当前状况和发展方向,主要关注结合长循环性、靶向性、胞内渗透性和造影能力的多功能纳米载体。

关键词: 纳米药物; 药物载体; 药物传递

中图分类号: R944 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0971(2007)03-0226-03

药物纳米载体可提高许多药物的药效。它们(包括脂质体、胶束、纳米乳、聚合物纳米粒、固体脂质纳米粒、柔性泡囊)经表面修饰后可获得可控的生物学性质,进而在治疗或诊断上同时执行多种重要功能。为制备这种智能的多功能药物纳米载体,需将各种化学分子同时组装到同一纳米粒表面。

1 药物纳米载体的基本性质:血液长循环性

机体防御系统把普通药物纳米载体当成外来颗粒,通过调理化作用在其发挥作用前清除出血液循环。因此任何多功能纳米载体应首先具有长循环的基本性质。长循环载体能缓慢聚集于具有血管渗漏性的病灶,如肿瘤、炎症和血管栓塞部位。它还能通过特异配体修饰增强靶向效果。用特定合成聚合物,如聚乙二醇(PEG)化学修饰纳米载体是延长体内循环的最常用方法。PEG阻滞调理作用的机制包括掩蔽表面电荷、增加表面亲水性、增强纳米粒与血液成分的排斥,以及在微粒表面形成聚合物层。

PEG作为一种保护性聚合物的优势包括水溶解性很好、链高度柔韧、毒性极低、没有免疫原性和抗原性,不在RES细胞中聚集,对修饰药物本身生物学性质影响很小。PEG不能生物降解,所以也不产生毒性代谢物。分子量小于40 kDa的PEG易从肾排泄。其他少数几种聚合物也可作为保护剂,如单端脂质修饰的聚丙烯酰胺、聚乙烯吡咯烷酮、聚丙烯酰

吗啉、磷脂酰聚甘油和聚乙烯醇。

疏水性聚合物纳米粒的表面修饰可用保护性聚合物物理吸附于微粒表面,或与微粒化学连接。还有一种重要长循环纳米载体由PEG和聚乳酸羟基乙酸共聚物的嵌段共聚物(PEG-PLGA)构成,有不溶的PLGA核和水溶性PEG壳,其中PEG含量越高,清除率越低,肝摄取越少。超顺磁纳米粒的表面修饰最近研究很多,并用于传递药物至局部淋巴结和用于诊断显影。表面的共聚物不仅减少了肝巨噬细胞对微粒的摄取,而且可将注射的纳米粒导入其他器官。疏水纳米粒和脂质体包裹相同聚合物后表达的生物学行为并不相同。小鼠生物分布实验表明,PEG-PE包裹的聚苯乙烯微粒的循环时间较长($t_{1/2}=4$ h)。与PAA包裹的脂质体不同,PAA包裹的纳米球血液清除速率与非包裹微粒相同,肝蓄积行为相近,但前者脾蓄积显著降低。泊洛沙姆(Poloxamer)407可避免纳米球被RES摄取,但对相同粒径的脂质体不起作用。细胞表面修饰PEG可减轻细胞移植(如输血)中的免疫识别。红细胞表面共价连接甲基化PEG后,免疫识别显著降低。

纳米载体进行聚合物保护的最重要生物学意义是循环时间显著延长和RES(肝)蓄积减少。这对临床非常重要。各种长循环纳米载体可通过增强渗透和滞留(EPR)效应有效地聚集于多种肿瘤。多个抗癌药物,如阿糖胞嘧啶、多柔比星、长春新碱已被制备成长循环脂质体。基于药代动力学观点,药物长循环纳米载体的显著作用包括延迟药物吸收,限制药物生物分布,降低药物生物分布容积,减少药物消除及减慢药物代谢。

收稿日期: 2007-02-27

作者简介: 邢磊,男,在读硕士研究生,研究方向: 药物新剂型与新技术, Tel: 010-66931220 E-mail: xinglei6x@163.com

2 靶向配体与保护性聚合物结合

药物纳米载体的深入发展是在长循环基础上增加特异靶向识别功能,即在纳米载体表面同时连接保护性聚合物和靶向基团。简单靶向纳米载体可通过连接相应配体(抗体、肽、糖基、叶酸等)获得。将蛋白质与脂质体膜上的反应基团共价连接是抗体偶合脂质体的常规制备方法。非膜亲水蛋白质(如抗体)经疏水试剂(如磷脂残基)化学修饰后可增加对脂质体膜的亲和力。长脂肪酸酰氯、活化磷脂(如氧化磷脂酰肌醇或N-戊二酰磷脂酰乙醇胺)作为疏水基团易与蛋白质结合。制备配体型长循环药物载体的理由有:载体表面连接配体使其血液清除和肝脾摄取可能增加,而空间保护聚合物可降低此效应;可有效蓄积于靶部位,甚至是血流少或表面抗原浓度低的靶组织。

为增强PEG化脂质体和其他微粒的靶向性,靶向配体应通过PEG间隔基与纳米载体连接,即配体伸展于PEG外侧,避免了后者阻挠前者与靶受体结合。用于空间保护脂质体和其他药物纳米载体的PEG脂偶合物一般源自甲氧基化PEG(mPEG),末端甲氧基为非反应性。因此再连接配体时需要末端功能化的脂质聚合物,一般通式为X-PEG-PE。大多数末端功能化PEG脂通过含羟基、羧基或氨基的异双功能化PEG衍生物合成。携配体的长循环PEG化纳米载体的制备方法包括:(1)纳米载体上的反应基团在水环境中与配体(蛋白质)反应,但此法可能使纳米载体交联;(2)将纯配体-PEG脂共聚物与其他脂质体成分(如卵磷脂和胆固醇)混合形成单层泡囊;(3)将PEG-PE修饰的配体插入脂质体。

各种肿瘤靶向抗体被应用于提高携药脂质体的疗效。核小体特异性单克隆抗体通过肿瘤细胞表面核小体识别不同肿瘤细胞,从而促进Doxil(多柔比星长循环PEG化脂质体)的肿瘤细胞靶向性,增强其体内细胞毒性。一种聚乳酸纳米粒表面经PEG和抗转铁蛋白修饰后得到PEG化免疫微粒,每个粒子含约65个键合抗体分子。转铁蛋白受体(TfR)在多种肿瘤细胞表面高表达。因此TfR抗体和转铁蛋白常用于促进纳米药物载体靶向性,以及促进阳离子脂质体的基因传递。转铁蛋白介导的脂质体还被成功地用于脑靶向。由于多种肿瘤细胞高表达叶酸受体,所以叶酸介导的纳米载体也常用于肿瘤靶向。超顺磁性纳米粒经叶酸修饰后(有或

没有PEG间隔基),增强了癌细胞摄取,可用于诊断和治疗。利用叶酸介导靶向的多功能树枝状聚合物也是研究热点。

3 增加刺激敏感功能

有时虽然载药纳米载体聚集于肿瘤组织,但药物释放差,难以杀死肿瘤细胞。细胞内吞摄取载体后,后者表面PEG可能阻止内含药物逸出内涵体进入胞浆。因此可在长循环PEG化药物载体上添加功能,使其在病灶特定刺激环境(如炎症和肿瘤的低pH值或提高温度)下PEG脱离。利用化学原理可解离PEG。由于乙烯酯、半胱氨酸基脂聚合物、双酯和脲在pH7.5左右稳定而在小于pH6时水解较快,所以它们可在吞噬空泡或肿瘤特有酸性环境中降解。pH敏感聚合物被用于制备刺激反应型药物传递系统。后者在血液循环和正常组织中稳定,但在低pH组织和细胞室内降解并释放药物,如肿瘤、栓塞部位、炎症区域和细胞内涵体。将PEG与pH敏感的N-异丙基丙烯酰胺甲基丙烯酸末端烷基共聚物一起接枝到同一脂质体上,就得到长循环PEG化pH敏感脂质体。基于二氨基丁烷聚丙烯酰胺和表面连接PEG并载有各种药物的树枝状聚合物也有酸敏感性。有些多功能药物传递系统也可采用在正常条件下PEG掩盖刺激敏感功能,而在PEG移除后显现。此系统须满足:(1)载体血液循环时间足够长,以适应EPR效应或靶向传递要求;(2)载体的靶细胞内化应快速,以避免降解及药物损失。

4 纳米载体的细胞内传递功能

许多生物活性化合物(包括大分子药物)必须胞内传递到细胞核或其他特定细胞器(如线粒体)才能发挥疗效,如需到达细胞核的基因和反义药物,靶向线粒体的细胞凋亡前药,需到达溶酶体的溶酶体酶等。但脂溶性的生物膜限制了这些化合物直接进行细胞内传递。大分子如DNA被内吞入内涵体后,很容易被大量的溶酶体酶降解。

4.1 正电荷与DNA细胞质传递

基于正电荷载体与负电荷DNA间的强静电作用,可得到阳离子脂(如Lipofectin)和DNA复合物(lipopolyplexes)以及阳离子聚合物(如PEI)和DNA复合物(polyplexes)。这两种复合物略带正电荷,可促进其与负电性细胞的相互作用,提高转染效率。新的DNA传递多功能载体还包括双金属纳米棒,它能

同时结合致密 DNA 质粒和靶向配体。

4.2 细胞质传递的 pH 敏感性

pH 敏感脂质体被胞吞后, 内涵体内低 pH 破坏脂质体, 后者与内涵体膜融合, 释放内容物至细胞质。内涵体成为外界物质进入细胞质的门户。用融合性脂质如不饱和的二油酰磷脂酰乙醇胺 (DOPE) 可得到 pH 敏感脂质体。多功能的长循环 PEG 化含 DOPE 的 pH 敏感脂质体虽然 pH 敏感性下降, 但仍能有效传递内容物至胞浆。最新的 pH 敏感脂质体添加剂包括油醇和 pH 敏感吗啉脂质 (吗啉单硬脂酰衍生物)。pH 敏感脂质体携抗体后可增强胞浆传递、靶向性, 以及受体介导的内吞摄取。

聚合物胶束也有 pH 敏感性。PEG 化聚天冬氨酸多柔比星胶束在内涵体低 pH 环境中易释放药物, 促进细胞质传递, 癌细胞毒性增强。反义寡核苷酸 (ODN) PEG 共聚物与一种阳离子融合肽 (KAIA) 共同构成胶束, 用于高效率胞内传递 ODN。在胶束脂组成部分添加有膜破坏功能的 Lipofectin 可增强胞内传递效率。许多膜破坏阴离子聚合物可增强药物和生物大分子内涵体逃逸, 如各种羧基聚合物、丙烯酸与甲基丙烯酸共聚物、马来酸共聚物、N-异丙基丙烯酰胺聚合物与共聚物 (NPAM)。

4.3 转导功能与细胞质传递

一种新型胞内药物传递方法, 采用特定蛋白质和肽修饰药物和药物载体后获得渗透进细胞的独特能力 (“蛋白质转导”现象)。从 HIV-1 获得的反式激活转录激活物 (TAT) 可促进各种细胞渗透。其他几种细胞渗透蛋白和肽 (CPP) 也有此能力。CPP 分为两类: 两亲性的螺旋肽, 如转运子和模型两亲性螺旋肽 (MAP); 富含精氨酸的肽, 如 TAT Ant 或穿膜肽。MAP 的细胞摄取最快, 传递效率最高, 其次为转运子、TATP 和穿膜肽。CPP 介导的细胞内传递可能有多种机制。TAT 介导的大分子和纳米粒的细胞内传递是能量依赖的胞饮过程, 并增强从内涵体中逸出进入胞浆; 而单独 CPP 和 CPP 介导的小分子的细胞渗透借助于静电作用和氢键, 并不依赖能量。

超顺磁氧化铁粒子 (SPION) 与 TATP 和荧光素异硫氰酸酯偶合后, 能快速被 T 细胞、B 细胞和巨噬细胞摄取, 并很快迁移至胞浆。生物相容的葡聚糖包裹的 TAT 衍生化 SPION 纳米粒的淋巴细胞内化能力比未修饰粒子增加 100 倍以上。核定位肽修饰的金

纳米粒可定位于细胞质和 (或) 细胞核。穿膜肽和 TAT 肽提高脂质体易位的效率与脂质体表面所结合肽分子数成正比。每个脂质体需至少结合 5 个肽分子才能提高脂质体胞内传递。

5 造影分子

纳米载体用于诊断、影像、实时测定生物分布和靶向蓄积需要将造影分子连接到多功能纳米载体上。目前应用的分子影像手段包括伽马成像、磁共振 (MR)、计算机断层扫描 (CT)、超声扫描。不管用哪种方法, 医学诊断影像要求目标区域有足够强度的相关信号, 以区分周围组织。但非增强影像技术只能用于相对较大的病理组织。用特定的纳米粒可携带多种造影分子并有效传递至目标区域, 增强信号。脂质体和胶束由于易控性和良好药理学特性而被特别关注。

报告金属的水溶性螯合物 (如 DTPA) 可包裹于脂质体内部, 或 DTPA 及类似螯合物疏水衍生化, 再插入脂质体表面。此方法已在 ^{111}In $^{99\text{m}}\text{Tc}$ Mn 和 Gd 脂质体上尝试过。两亲性螯合探针 (顺磁 Gd-DTPA-PE 和放射性 ^{111}In -DTPA-SA) 可与 PEG (5 ku)-PE 胶束结合, 用于体内磁共振和闪烁影像。分子脂溶性部分可插入胶束疏水中心, 而亲水性螯合物则分布于胶束亲水层。为进一步增强脂质体的诊断分子携带能力, 具有多个报告金属原子和疏水基团的多螯合聚合物 (PAP) 被合成。它可吸附于疏水性纳米粒, 或插入脂质体或胶束的疏水区域。将 Gd-PAP 脂质体皮下注射于家兔右前爪 5 min 后, 横断扫描显示腋下和肩胛骨下淋巴结已有分布。自组装两亲性聚合物 (如 PEG-PE) 形成的胶束也可携带两亲性多螯合物。

6 多功能化中的化学反应

多功能分子的连接可为非共价, 借助疏水性吸附。但更常用的是通过载体表面和分子的反应基团进行化学连接。主要有 3 种反应: 活化羧基与氨基形成酰胺; 吡啶二巯基与巯基形成二硫键; 马来酰亚胺衍生物与巯基形成硫醚。其他方法包括对硝基苯羰基与纳米载体表面上各种配体的氨基形成氨基甲酸酯。某些有糖类残基的配体易氧化产生醛基, 可与载体表面氨基生成希夫碱。