

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.02.021

免疫脂质体在肿瘤治疗中的应用

Application of immunoliposome in oncotherapy

何驰^{1,2}, 吴婷婷³ 综述; 杨峰¹ 审阅(1. 第二军医大学药学院, 上海 200433; 2. 解放军第 15 医院, 新疆 乌鲁木齐 833000; 3. 北京军区总医院 263 临床部 药械科, 北京 101149)

[摘要] 免疫脂质体具有主动靶向性、降低肿瘤药物的治疗毒性、提高药物治疗指数等特点, 在肿瘤治疗研究中被广泛使用作为肿瘤化疗和放疗药物、基因治疗和肿瘤影像学诊断治疗的载体。作为常见肿瘤药物治疗靶向载体, 免疫脂质体可提高药物疗效, 降低毒性; 作为肿瘤基因治疗载体, 免疫脂质体可提高 siRNA 的稳定性与靶向性; 作为放射治疗的载体, 免疫脂质体可在细胞或者亚细胞水平对肿瘤组织进行靶向显影, 具有影像监测和放射性治疗的双重潜能。随着功能结构复合化、靶标优化筛选等方面的进展, 免疫脂质体在肿瘤治疗领域将有更广阔的应用前景。

[关键词] 免疫脂质体; 肿瘤; 治疗; 靶向载体

[中图分类号] R730.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2012)02-0215-04

脂质体是以胆固醇及磷脂为主要成分具有脂质双分子层结构的微型囊泡, 于 1965 年问世, 并在 1972 年被首次用作为药物载体^[1]。由于脂质体作为载体具有生物相容性好、免疫原性低、毒性弱、生物活性可调等诸多优势, 得到了国内外研究者的广泛关注, 并进行了大量研究。在肿瘤治疗领域, 脂质体已成为目前最为成熟的药物载体系统之一。但是脂质体在循环系统中易被单核吞噬细胞系统摄取清除^[2], 且主要富集于网状内皮组织丰富的器官如肝脏、脾等, 使得药物难以在靶部位达到有效的治疗浓度。在脂质体表面锚挂聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 是目前增加脂质体稳定性, 延长其半衰期的最有效方法^[3]。在此基础上, 通过共价结合等方法在脂质双分子层表面偶联可与肿瘤细胞特异性结合的抗体、配体、糖类等归巢装置, 使脂质体选择性地与靶组织在细胞或亚细胞水平结合, 定向释放药物, 这类脂质体称为主动靶向脂质体^[4]。其中, 以抗体介导的主动靶向脂质体即免疫脂质体的研究及应用最为广泛和常见^[5]。现将近年来免疫脂质体在肿瘤治疗方面的应用研究做如下综述。

1 免疫脂质体的特点

免疫脂质体是指利用肿瘤细胞表面某些特异表达或过度表达的抗原与抗体的特异性识别机制, 将单克隆抗体或抗体片段定向连接在脂质体表面, 而形成的主动靶向脂质体。免疫脂质体的应用得益于可大规模生产抗体的杂交瘤技术及抗体的人源化技术。由于这种抗原-抗体的特异结合, 免疫脂质体可

主动靶向肿瘤细胞, 增加药物被肿瘤细胞吞噬的机会^[6], 减少对正常组织细胞的损伤, 降低药物毒性作用, 提高药物治疗指数, 甚至克服肿瘤细胞的多药耐药^[7]。同时抗体与肿瘤细胞结合后, 可触发补体和抗体依赖的细胞毒作用, 使得免疫脂质体上所连抗体可具有主动靶向性和协同细胞杀伤作用的双重功能^[8]。免疫脂质体可作为肿瘤化疗、放疗、基因治疗和影像学诊断及监测等的优良载体, 具有广阔的应用前景。

2 免疫脂质体在肿瘤治疗中的应用

2.1 免疫脂质体作为肿瘤药物治疗的载体

药物治疗是肿瘤治疗的重要手段之一, 但目前的一线化疗药物如氟尿嘧啶 (5-fluorouracil)、多柔比星 (doxorubicin)、顺铂 (cisplatin) 等都因为其毒性作用及多药耐药性限制了其临床应用。而新型抗癌药物成本高昂、研发周期过长, 无法满足临床需要。因此利用新的剂型如免疫脂质体, 以提高药物疗效、降低毒性作用成为了研究的热点^[9]。

Yang 等^[8]制备了连接曲妥珠单抗 (trastuzumab)

[基金项目] 上海高校选拔培养优秀青年教师科研专项基金资助 (No. egd09014)。Project supported by the Shanghai Scientific Special Funds for Cultivation and Selection of Excellent Young Teachers (No. egd09014)

[作者简介] 何驰 (1988-), 男, 四川省射洪人, 本科, 助教, 主要从事新型靶向药物制剂研究。E-mail: 276964508@qq.com

[通信作者] 杨峰 (YANG Feng, corresponding author), E-mail: yang-feng1008@126.com

的 PEG 化紫杉醇免疫脂质体 (paclitaxel-loaded pegylated immunoliposome, PIL) 用于乳腺癌的治疗研究。肿瘤细胞对免疫脂质体的摄取量显著高于单纯的 PEG 化紫杉醇脂质体 (paclitaxel-loaded pegylated liposomes, PL), 也高于常用药物紫杉醇 (taxol) 及曲妥珠单抗与 PLs 的单纯混合物。对于 HER-2 表达较高的细胞系如 BT-474, PILs 的 IC_{50} (451.3 nmol/L) 低于 PLs (1 645.9 nmol/L) 甚至是紫杉醇 (675.8 nmol/L)。同时, 曲妥珠单抗-空脂质体及硫醇化曲妥珠单抗与曲妥珠单抗的抗肿瘤细胞作用无明显差异。这说明, 免疫脂质体表面连接的抗体具有靶向和抗肿瘤的双重功效。对荷瘤小鼠的在体实验发现, PIL 在体内的组织药物浓度与血浆药物浓度之比显著高于对照组。另外, 60 d 后测定肿瘤体积发现, PIL 组仅分别为紫杉醇与 PLs 组的 25% 与 42%。

Kim 等^[10]制备了偶联抗上皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 抗体的 pH 敏感的脂质体 (antibody-targeted pH-sensitive liposome, Ab-PSL), 包埋抗癌药物吉西他滨 (gemcitabine)。设立 Ab-PSL-gem 组 (80、160 mg/kg), PSL-gem 组 (80、160 mg/kg), 游离 gem 组 (160 mg/kg) 以及空白对照组。以异体移植人非小细胞肺癌细胞的荷瘤裸鼠为模型, 定期尾静脉给药, 并测定肿瘤体积。首次注射 1 个月后, 空白对照组肿瘤体积增加 20 倍, 而 Ab-PSL-gem (160 mg/kg) 组体积只增加 3.26 倍 ($P < 0.01$), 同时比 PSL-gem (160 mg/kg) 组小 2~3 倍。1 个月后 Ab-PSL-gem 组肿瘤体积不再增加, 而其他组均有增加。Ab-PSL-gem 组肿瘤体积增长速率显著低于空白对照组, 而 PSL-gem 组于空白组无明显区别。通过计算得出 Ab-PSL-gem (160 mg/kg) 组增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 指数明显低于其他组及空白组, 而原位末端转移酶标记检测 (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling assay, TUNEL) 显著高于其他组及空白组。

Barrajoń-Catalón 等^[11]将抗 Her-2 的单抗 trastuzumab 介导载有抗癌药物蜂毒肽的脂质体 (lytic immunoliposomes with trastuzumab, AbDR) 用于培养的乳腺癌细胞中, 并以空白免疫脂质体及空白溶液对照, 发现 AbDR 对癌细胞生长的抑制效果显著高于其他组, 细胞死亡率达 30%~40%。且抑制效果与肿瘤细胞表面 Her-2 表达量呈正相关。采用 Image Stream 技术分析, 显示 AbDR 组所结合细胞数显著高于 DR (非免疫脂质体, lytic liposome without antibody) 组。用荧光显微成像观察发现, 在给药 1~3 h

内, 肿瘤细胞即发生溶解凋亡。

2.2 免疫脂质体作为肿瘤基因治疗的载体

小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 可使靶基因沉默而抑制其表达。由于 siRNA 的特异性、高效性使其成为肿瘤基因治疗的一大热点^[9,12]。但是由于其在循环系统中半衰期短, 稳定性差, 难以到达靶位, 成为制约其应用的最大障碍^[13]。使用多聚阳离子脂质体, 特别是偶联抗体等靶向物之后, 可大大提高 siRNA 的稳定性与靶向性^[14]。

Gao 等^[15]制备了抗-荧光素酶 siRNA 的 RNA-阳离子脂质体聚合物, 并连以抗-EGFR 抗体 Fab 片段 (TLPD conjugated with anti-EGFR Fab by conventional conjugation, TLPD-FC), 以非靶向脂质体 (non-targeted LPD) 为对照品, 用于抗乳腺癌的研究。体外细胞实验发现, TLPD-FC 的转运效率及抗荧光素酶活性均高于对照组。体内实验利用 IVIS 成像系统检测, 发现 TLPD-FC 及对照组在肿瘤组织内均有蓄积, 24 h 后 TLPD-FC 组仍有清晰信号, 而对照组信号极小, 空白组无信号。在除肾以外的主要脏器中无明显蓄积。用共聚焦显微技术检测给药后的荷瘤小鼠, 发现 TLPD-FC 组在肿瘤组织中大量富集, 且存在胞质中。而 NTLPD 组与空白组无明显差别。且肿瘤组织中荧光素酶活性 TLPD-FC 组显著高于对照, 证明 TLPD-FC 较 NTLPD 有更强的靶向性。Miriam 等^[16]利用结合 AML1/MTG8 融合蛋白基因的 siRNA 包载于连接抗-CD33 抗体片段的免疫脂质体用于急性骨髓型白血病的治疗研究。荧光标记 siRNA, 通过荧光信号检测发现, CD33 阳性的细胞系对 siRNA 的摄取达 30%~50%, 而非靶向免疫脂质体极少结合, 免疫脂质体在 CD33 阴性的细胞系几乎没有信号。同时, 免疫脂质体相较非靶向免疫脂质体及非配对 siRNA 免疫脂质体, 对 AML1/MTG8 融合蛋白的表达有显著的抑制作用, 并明显抑制肿瘤细胞集落形成。

2.3 免疫脂质体作为放射治疗的载体

常规的肿瘤放疗难以避免对正常组织造成损害, 且对许多恶性肿瘤治疗效果不理想。硼中子俘获治疗 (boron neutron capture therapy, BNCT) 使热中子照射靶向聚集于肿瘤组织的¹⁰B 产生 α 射线, 靶向杀伤肿瘤细胞。该方法的关键在于将¹⁰B 有效地转运进入靶细胞中发挥作用^[17]。而从目前的研究来看免疫脂质体作为载体能较好的解决这一问题。Bin 等^[18]利用抗 EGFR 导向的镍脂质体搭载含硼卡钠, 对成胶质细胞瘤的硼中子俘获治疗进行研究。发现硼卡钠可有效转移进入 EGFR 高表达的肿

瘤细胞系,可进入胞内聚集于细胞核,非靶向对照组胞内 10B 水平极低。对脑肿瘤小鼠的体内研究发现,实验组能在肿瘤组织及血管中检测到很强的 10B 信号,且在正常组织中无明显信号,非靶向对照组无明显信号。胞内硼卡钠浓度实验组约为对照组的 8 倍,48 h 后浓度仍维持在 75%。

2.4 免疫脂质体在肿瘤影像学检测中的应用

用脂质体包载显影物质,特别是在偶联了抗体等特异性靶向物质制成免疫脂质体后可在细胞或者亚细胞水平对肿瘤组织进行靶向显影,在分子水平监测肿瘤病变,有利于其早期诊断,并对治疗效果进行分子水平的监测^[19-20]。在包载放射性同位素做显影剂时,甚至具有影像监测和放射性治疗的双重潜能^[21]。

为进行肿瘤的体内实时荧光检测的研究, Bin 等^[22]将荧光素酶融合蛋白与抗 EGFR 抗体连接,定向偶联与脂质体表面制成免疫脂质体,同时包载荧光剂 8-羟基-1,3,6-苊三磺酸钠。与 EGFR 高表达的肿瘤细胞体外孵育后在细胞内检测到很强的荧光信号。而非免疫脂质体孵育后则只有极弱的信号。荷瘤小鼠静脉注射后,免疫脂质体组在肿瘤部位检测到很强荧光信号,而在正常组织中无明显信号。非免疫脂质体组在肿瘤组织或正常组织中均无明显信号。

在众多的显影技术中,磁共振成像具有空间分布高的优点,尤其是以脂质体包载特异靶向对比剂之后可以提供更加充分的生理学和解剖学信息,可能有更广泛的应用前景^[23]。Yang 等^[24]利用纳米免疫脂质体包载超顺磁金属氧化物(superparamagnetic iron oxide, SPIO)进行生物体外和体内试验,体外试验结果证实,这种方法肿瘤细胞吸收 SPIO 的量达常规 SPIO 的 11 倍之多,活体注射证明这种免疫脂质体能特异、高效地将 SPIO 输送到肿瘤细胞内,并能在磁共振成像影像中显示。

3 免疫脂质体用于肿瘤治疗的发展趋势

资料^[25]显示,近年来复合型多功能免疫脂质体的制备和应用得到了广泛的关注,例如将磁敏、热敏以及 pH 敏感的材料用于免疫脂质体的制备,根据微环境的不同选择性释药,使得其靶向作用更加精确,甚至可至亚细胞水平^[26-27]。还有利用放射性物质在放疗和显影两方面的作用,包埋或者连接放射性物质,制备具有靶向治疗和影像检测等多种功能的免疫脂质体。在靶头的选择上,抗体片段由于保留了较高特异性而且比完整抗体作为靶向物质还具

有血浆半衰期长、生产成本低(可采用微生物发酵技术生产),免疫原性低,与脂质体连接效率高等优点,有可能逐步取代了完整抗体作为一种更为合理有效的靶向物质^[28-29]。近年来还有通过噬菌体展示法来进行一些亲和性特异性更强的多肽小分子片段作为靶头^[30];这是一类抗体的模仿物,相对分子质量一般只有 6 000 ~ 8 000,可由微生物合成或直接合成,结构稳定,适于大规模生产,分子小,穿透力强,且亲和力更高^[31-32]。

4 结 语

免疫脂质体作为一种新型的释药系统在肿瘤生物治疗中具有独特的优势,但是要真正用于临床造福人类还有很多问题需要解决,如成本高昂、工艺复杂、载药量小、稳定性差等;适用于临床给药的制剂学以及体内代谢动力学模型缺乏完整的质量评价和标准;患病宿主体内正常细胞中也有少量的表达,可能引起不良反应;抗体或其片段可能存在免疫原性;同时免疫脂质体对肿瘤细胞的靶向的治疗依赖于细胞表面异常表达或者高表达的某些抗原,所以寻找有效的靶点,增加免疫脂质体的抗瘤谱也非常重要^[33-35]。尽管免疫脂质体用于肿瘤的临床治疗尚需时日,但是应当肯定其在提高疗效,减少毒性作用等方面具有不可忽视的优点。相信随着对肿瘤研究的深入,对抗原-抗体认识的加深,肿瘤免疫学、细胞生物学和分子生物学等学科的发展以及生产设备和工艺的不断改进完善,在不久的将来,免疫脂质体一定会成为战胜肿瘤的有效手段之一。

[参 考 文 献]

- [1] Huang A, Kennel SJ, Huang L. Immunoliposome labeling: A sensitive and specific method for cell surface labeling [J]. J Immunol Methods, 1981, 46(2): 141-151.
- [2] Freise J, Müller WH, Brölsch C, et al. "In vivo" distribution of liposomes between parenchymal and non parenchymal cells in rat liver [J]. Biomedicine, 1980, 32(3): 118-123.
- [3] Schnyder A, Huwyler J. Drug transport to brain with targeted liposomes [J]. Neuro Rx, 2005, 2(1): 99-107.
- [4] Liu Y, Li K, Liu B, et al. A strategy for precision engineering of nanoparticles of biodegradable copolymers for quantitative control of targeted drug delivery [J]. Biomaterials, 2010, 31(35): 9145-9155.
- [5] Loomis K, Smith B, Feng Y, et al. Specific targeting to B cells by lipid-based nanoparticles conjugated with a novel CD22-ScFv [J]. Exp Mol Pathol, 2010, 88(2): 238-249.
- [6] Ghaghada KB, Saul J, Natarajan JV, et al. Folate targeting of drug carriers: A mathematical model [J]. J Control Release,

- 2005, 104(1): 113-128.
- [7] Mamot C, Drummond DC, Hong K, et al. Liposome-based approaches to overcome anticancer drug resistance [J]. *Drug Resist Updat*, 2003, 6(5): 271-279.
- [8] Yang T, Choi MK, Cui FD, et al. Antitumor effect of paclitaxel-loaded PEGylated immunoliposomes against human breast cancer cells [J]. *Pharm Res*, 2007, 24(12): 2402-2411.
- [9] Baker M. RNA interference: Homing in on delivery [J]. *Nature*, 2010, 464(7292): 1225-1228.
- [10] Kim IY, Kang YS, Lee DS, et al. Antitumor activity of EGFR targeted pH-sensitive immunoliposomes encapsulating gemcitabine in A549 xenograft nude mice [J]. *J Control Release*, 2009, 140(1): 55-60.
- [11] Barrajón-Catalán E, Menéndez-Gutiérrez MP, Falco A, et al. Selective death of human breast cancer cells by lytic immunoliposomes: Correlation with their HER2 expression level [J]. *Cancer Lett*, 2010, 290(2): 192-203.
- [12] Chen Y, Zhu X, Zhang X, et al. Nanoparticles modified with tumor-targeting scFv deliver siRNA and miRNA for cancer therapy [J]. *Mol Ther*, 2010, 18(9): 1650-1656.
- [13] Oh YK, Park TG. siRNA delivery systems for cancer treatment [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61(10): 850-862.
- [14] Buyens K, Demeester J, De Smedt SS, et al. Elucidating the encapsulation of short interfering RNA in PEGylated cationic liposomes [J]. *Langmuir*, 2009, 25(9): 4886-4891.
- [15] Gao J, Liu W, Xia Y, et al. The promotion of siRNA delivery to breast cancer overexpressing epidermal growth factor receptor through anti-EGFR antibody conjugation by immunoliposomes [J]. *Biomaterials*, 2011, 32(13): 3459-3470.
- [16] Rothdiener M, Müller D, Castro PG, et al. Targeted delivery of siRNA to CD33-positive tumor cells with liposomal carrier systems [J]. *J Control Release*, 2010, 144(2): 251-258.
- [17] 罗全勇, 朱瑞森. 硼中子俘获治疗 [J]. *同位素*, 2004, 17(3): 174-177.
- [18] Feng B, Tomizawa K, Michiue H, et al. Delivery of sodium borocaptate to glioma cells using immunoliposome conjugated with anti-EGFR antibodies by ZZ-His [J]. *Biomaterials*, 2009, 30(9): 1746-1755.
- [19] Cindy ME, Prudhomme RK. Multifunctional nanoparticles for imaging, delivery and targeting in cancer therapy [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2009, 6(8): 865-878.
- [20] Ting G, Chang CH, Wang HE. Cancer nanotargeted radiopharmaceuticals for tumor imaging and therapy [J]. *Anticancer Res*, 2009, 29(10): 4107-4118.
- [21] Freedman M, Chang EH, Zhou Q, et al. Nanodelivery of MRI contrast agent enhances sensitivity of detection of lung cancer metastases [J]. *Acad Radiol*, 2009, 16(5): 627-637.
- [22] Feng B, Tomizawa K, Michiue H, et al. Development of a bifunctional immunoliposome system for combined drug delivery and imaging *in vivo* [J]. *Biomaterials*, 2009, 31(14): 4139-4145.
- [23] Lanza GM, Lamerichs R, Caruthers S, et al. Molecular MR imaging of melanoma angiogenesis with alphanubeta3-targeted paramagnetic nanoparticles [J]. *Medicamundi*, 2003, 47(1): 34-39.
- [24] Kozłowska D, Foran P, MacMahon P, et al. Molecular and magnetic resonance imaging: The value of immunoliposomes [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61(15): 1402-1411.
- [25] Ying X, Wen H, Lu WL, et al. Dual-targeting daunorubicin liposomes improve the therapeutic efficacy of brain glioma in animals [J]. *Control Release*, 2010, 141(2): 183-192.
- [26] Simard P, Leroux JC. pH-sensitive immunoliposomes specific to the CD33 cell surface antigen of leukemic cells [J]. *Int J Pharm*, 2009, 381(2): 86-96.
- [27] Pattillo CB, Venegas B, Donelson FJ, et al. Radiation-guided targeting of combretastatin encapsulated immunoliposomes to mammary tumors [J]. *Pharm Res*, 2009, 26(5): 1093-1100.
- [28] Weisser NE, Hall JC. Applications of single-chain variable fragment antibodies in therapeutics and diagnostics [J]. *Biotechnol Adv*, 2009, 27(4): 502-520.
- [29] Manjappa AS, Chaudhari KR, Venkataraju MP, et al. Antibody derivatization and conjugation strategies: Application in preparation of stealth immunoliposome to target chemotherapeutics to tumor [J]. *J Control Release*, 2011, 150(1): 2-22.
- [30] Beuttler J, Rothdiener M, Müller D, et al. Targeting of epidermal growth factor receptor (EGFR)-expressing tumor cells with sterically stabilized affibody liposomes (SAL) [J]. *Bioconjug Chem*, 2009, 20(6): 1201-1208.
- [31] Puri A, Loomis K, Smith B, et al. Lipid-based nanoparticles as pharmaceutical drug carriers: From concepts to clinic [J]. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 2009, 26(6): 523-580.
- [32] Alexis F, Basto P, Levy-Nissenbaum E, et al. HER-2-targeted nanoparticle-affibody bioconjugates for cancer therapy [J]. *Chem Med Chem*, 2008, 3(12): 1839-1843.
- [33] Buse J, El-Aneed A. Properties, engineering and applications of lipid-based nanoparticle drug-delivery systems: Current research and advances [J]. *Nanomedicine (Lond)*, 2010, 5(8): 1237-1260.
- [34] Li Q, Gao HJ, Ma J. The Application of immunoliposome in targeted therapy in cancer [J]. *Medical Recapitulate*, 2011, 17(6): 852-854.
- [35] Krieger ML, Eckstein N, Schneider V, et al. Schneider V, Overcoming cisplatin resistance of ovarian cancer cells by targeted liposomes *in vitro* [J]. *Int J Pharm*, 2010, 389(1/2): 10-17.
- [收稿日期] 2011-11-12 [修回日期] 2012-01-09
[本文编辑] 王莹