聚乙二醇-脂质衍生物修饰对脂质体稳定性的影响

徐洋1,石莉2,邓意辉1*

(1. 沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016; 2. 辽宁省药物研究院, 辽宁 沈阳 110015)

摘要:聚乙二醇-脂质 (polyethylene glycol-lipid, PEG-lipid) 衍生物具有增加脂质体的稳定性、延长其血液循 环半衰期、提高其肿瘤靶向效率及增强药物疗效等优势。深入研究不同 PEG-lipid 衍生物修饰对脂质体的物理、 化学和生物学稳定性的影响,有利于解决目前 PEG 化脂质体存在的问题,如静脉重复注射时引起的加速血液消 除 (accelerated blood clearance, ABC) 现象,为开发新型靶向制剂奠定基础。本文主要综述了 PEG 与脂质之间的 连接键如酰胺键、醚键、酯键和二硫键,脂质种类如常用的磷脂酰乙醇胺、胆固醇和二酰甘油,脂质的性质即脂 肪链长度与饱和度, PEG 的端基如甲氧基、羧基、氨基, PEG 的相对分子质量和 PEG-lipid 的摩尔比对 PEG 化脂 质体在体内外稳定性的影响。

关键词:聚乙二醇-脂质衍生物;脂质体;稳定性 中图分类号:R943 文献标识码:A 文章编号:0513-4870 (2011) 10-1178-09

Effect of polyethylene glycol-lipid derivatives on the stability of grafted liposomes

XU Yang¹, SHI Li², DENG Yi-hui^{1*}

School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China;
 Liaoning Institute of Pharmaceutical Industry, Shenyang 110015, China)

Abstract: It is reported that polyethylene glycol-lipid (PEG-lipid) derivatives increase liposomes stability, prolong the blood circulation of liposomes, enhance their tumor-targeting efficiency, and improve drug efficacy. Therefore, it is of great importance to investigate the influence of modified PEG-lipid derivatives on the physical, chemical, and biological characteristics of liposomes for the promotion of dealing with the existed problems, such as the accelerated blood clearance (ABC) phenomenon when repeated intravous injection at a certain time-interval, and developing novel targeted pharmaceutical preparations. In this review, the effects of modified PEG-lipid derivatives were summarized in many aspects. It indicats that the chemical bonds (amide, ether, ester, and disulfide) between PEG and lipid, as well as the species of lipids, such as the commonly used phosphatidylethanolamine, cholesterol, and diacylglycerol have substantial effects on the grafted liposomes stability in vitro and in vivo. Besides, the properties of lipids (the fatty acid chain length and saturation) and the groups (methoxy, carboxylic and amino) at the distal ends of the PEG chains were also considered to be important factors. In the end, the influence of the average molecular weight of PEG and the molar ratio of PEG-lipid derivatives in the total lipid were further focused.

Key words: PEG-lipid derivative; liposome; stability

收稿日期: 2011-05-09.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81072602)

^{*}通讯作者 Tel / Fax: 86-24-23986316, E-mail: dds-666@163.com

脂质体作为药物传递系统,在生物医学和药学领域中倍受青睐。但是普通脂质体存在融合聚集磷脂成分可与血液中的高密度脂蛋白的载脂蛋白A-1发生互换,并激活补体系统引起包封药物的渗漏和脂质体的裂解^[1, 2],以及易被单核巨噬细胞系统 (mononuclear phagocyte system, MPS) 快速清除,使药物不能到达靶部位有效发挥作用^[3, 4]等问题。在某种程度上限制了其在临床上的广泛应用。

1987~1988 年在脂质体发展史上有了重要的 突破, Allen 等^[3]和 Gabizon 等^[4]发现将神经节单苷脂 (monosialoganglioside, GM₁) 插入磷脂双分子层中可 有效延长脂质体的血液循环时间, 首次提出长循环 脂质体 (long circulating liposome) 的概念。1990 年 Blume 等^[5]和 Klibanov 等^[6]尝试使用合成的聚乙二 醇-脂质 (polyethylene glycol-lipid, PEG-lipid) 衍生 物来增加其修饰脂质体的体内外稳定性, 并取得了 里程碑式的研究进展。由于 GM₁ 存在提纯与合成方 面的困难、价格相对昂贵、临床大量使用时具有一定 的免疫毒性等问题^[7], 因此目前普遍使用价格相对较 低、种类繁多、合成过程简单易行、质量可控、安全 性高、生物相容性良好及修饰效果较佳的 PEG-lipid 衍生物来修饰脂质体^[6-9]。

PEG-lipid 衍生物修饰可增加脂质体的物理、化 学及生物学稳定性,其机制可能是高柔顺性的 PEG 分子在脂质体膜表面形成亲水层,这种空间位阻效 应可阻止脂质体之间的融合聚集,减弱血浆成分对 脂质体的破坏或识别与吸附作用,从而降低 MPS 的 摄取量,延长血液循环半衰期,提高肿瘤靶向效率, 增强药物疗效,降低毒副作用^[6-10]。因此 PEG-lipid 衍生物在脂质体膜表面的稳定性是影响其修饰效果 的关键。影响其稳定性的因素主要包括: PEG 与脂质 的连接键 (如酰胺键、醚键、酯键和二硫键等)、脂 质的种类[如磷脂酰乙醇胺 (phosphatidylethanolamine, PE)、胆固醇 (cholesterol, CHOL)、二酰基甘油 (diacylglycerol, DAG) 和脂肪酸 (fatty acid, FA)等] 及脂质的性质 (如脂肪链的长度与饱和度等)、PEG 相对分子质量和 PEG-lipid 衍生物的摩尔比等。

近年来的研究发现, PEG-lipid 衍生物修饰也存 在一些不能忽视的问题, 如静脉重复注射 PEG 化脂质 体可加速血液清除 (accelerated blood clearance, ABC) 的现象, 即向同一动物体内静脉重复注射 (间隔几 天) PEG 化脂质体时, 第2次注射的 PEG 化脂质体在 血液循环中被迅速清除, 肝脾分布量显著增加^[11], 大 大限制了其临床应用。因此应综合考虑 PEG 化制剂 的物理、化学及生物学稳定性和 ABC 现象等因素, 选择合适的 PEG-lipid 衍生物进行修饰。关于 PEG 化 脂质体 ABC 现象的研究进展及影响因素已有综述报 道^[11],故本文主要就不同 PEG-lipid 衍生物对脂质体 体内外性质的影响进行概述。

1 连接键对 PEG-lipid 修饰效果的影响

1.1 不同连接键对聚乙二醇-磷脂酰乙醇胺 (PEG-PE) 修饰效果的影响 Parr 等^[12]用薄层色谱法测定 了含有不同连接键的单甲氧醚聚乙二醇 2000 (mPEG2000) 与棕榈酰油酰磷脂酰乙醇胺 (POPE) 形 成的衍生物 mPEG2000-POPE 在 37 ℃小鼠血浆中孵育 24 h 时的化学稳定性。结果表明, 与酰胺键或氨基 甲酸酯键相比,琥珀酸酯键的稳定性略低。mPEG2000 与二硬脂酰磷脂酰乙醇胺 (DSPE) 以琥珀酸酯键相 连形成的衍生物 mPEG2000-S-DSPE (图 1a) 修饰的由 二硬脂酰磷脂酰胆碱 (DSPC) 和 CHOL (摩尔比为 55:45) 组成的脂质体, 与 37 ℃小鼠血浆孵育 24 h 后, 摩尔比为 5%的 mPEG₂₀₀₀-S-DSPE 在膜表面残 留量约为 90%。进一步用同位素标记法测定 24 h 时 脱落的[³H]mPEG₂₀₀₀和 mPEG₂₀₀₀-S-[³H] DSPE 的量, 前者脱落量约为 10%而后者几乎为零, 这说明 mPEG2000-S-DSPE 从膜表面脱落主要是因为琥珀酸 酯键的水解。



Figure 1 Structures of mPEG-S-DSPE (a) and mPEG-A-DSPE (b)

Parr 等^[12]继续考察了分别向小鼠尾静脉注射 普通脂质体、摩尔比为 5%的 mPEG₂₀₀₀-S-DSPE 修 饰或 mPEG₂₀₀₀与 DSPE 以酰胺键相连形成的衍生物 mPEG₂₀₀₀-A-DSPE (图 1b) 修饰的 DSPC/CHOL (摩尔 比为 55:45) 脂质体的血液浓度和肝脾聚集情况。结 果表明,24 h 时普通脂质体的血液浓度约为注射剂量 的 (0.2 ± 0.1) %, 肝脾聚集量分别约为 (56.4 ± 3.3) % 和 (7.8 ± 1.5) %; 而 mPEG₂₀₀₀-S-DSPE 或 mPEG₂₀₀₀-A-DSPE 修饰的脂质体的血液浓度则分别增至 (16.3 ± 1.1) %和 (18.0 ± 0.9) %, 肝脏聚集量降低到 (24.9 ± 1.1) %和 (18.0 ± 0.9) %, 肝脏聚集量降低到 (24.9 ± 1.1) % 2.6)%与(18.8±1.4)%,分布在脾脏的量仅为(1.60±0.1)%和(1.41±0.1)%。因此,与普通脂质体相比,摩尔比为5%的mPEG2000-S-DSPE或mPEG2000-A-DSPE修饰的脂质体在血液中循环时间显著延长,肝脾聚集量急剧降低。由于mPEG2000-S-DSPE与mPEG2000-A-DSPE的修饰效果相似,故研究者推测mPEG-DSPE在膜表面的稳定性主要由脂质部分的锚定能力决定。

Kirpotin 等^[13]研究表明, 与 37 ℃人血浆孵育 36 h 后, 摩尔比为 3%或 6%的 mPEG2000-A-DSPE 修饰的 二油酰磷脂酰乙醇胺 (DOPE) 脂质体中药物释放量 基本为零,而 mPEG2000 与 DSPE 以二硫键相连形成 的衍生物即 mPEG2000-S-S-DSPE (图 2) 修饰时药物 泄漏量则分别约为10%和5%。但是上述脂质体与含 二硫苏糖醇 (诱导二硫键断裂) 的羟乙基哌嗪乙硫 磺酸-氯化钠溶液 37 ℃孵育 2 h 后, mPEG2000-S-S-DSPE 修饰的脂质体快速融合聚集并几乎完全释放包 封药物,而 mPEG₂₀₀₀-A-DSPE 修饰时药物无明显的 释放行为。Ishida 等^[14]的结果也显示, mPEG₂₀₀₀-A-DSPE (摩尔比为 2%) 修饰的由 DOPE 和胆固醇半琥 珀酸酯 (CHEMS) (摩尔比为 6:4) 组成的脂质体在 90%的人血浆 37 ℃孵育 24 h, 阿霉素缓慢从脂质体 内释放, 24 h 累积释放量接近 100%。而 mPEG₂₀₀₀-S-S-DSPE 修饰时, 药物则在 4 h 左右就基本释放完全。 体内研究进一步发现摩尔比为 3%~10%的 mPEG2000-A-DSPE 修饰可显著延长 DOPE 或 DOPE/CHEMS 脂 质体在小鼠体内的循环时间, 且循环时间随 mPEG2000-A-DSPE浓度的增大而增加。相比之下,摩 尔比为 2%~9%的 mPEG2000-S-S-DSPE 和摩尔比为 1%的 mPEG₂₀₀₀-A-DSPE 混合修饰时, 脂质体的血液 清除速度加快,而且mPEG2000-S-S-DSPE摩尔比的增 加并未显著影响脂质体的药动学行为。这说明

mPEG₂₀₀₀-S-S-DSPE 的二硫键在体内的稳定性较差, 可被血浆中的成分 (如半胱氨酸) 快速水解而断裂, 使 PEG 层的空间位阻效应降低或消失,故其修饰的 脂质体在体内外稳定性较差。有关其他可断裂 PEGlipid 衍生物在脂质体方面的应用概况见文献^[15]。



Figure 2 Structure of mPEG₂₀₀₀-S-S-DSPE

1.2 不同连接键对聚乙二醇-胆固醇 (PEG-CHOL) 修饰效果的影响 Xu 等^[16]报道在 37 ℃的 75%胎牛 血清溶液 (fetal bovine serum, FBS) 中孵育 24 h, 摩 尔比为 6%的单甲氧醚聚乙二醇 2000-胆固醇半琥珀 酸酯 (mPEG2000-CHEMS) (图 3a) 或单甲氧醚聚乙二 醇 2000-胆固醇碳酸甲酯 (mPEG2000-CHMC) (图 3b) 从由蛋黄卵磷脂 (EPC) 和 CHOL (重量比为 4:1) 组成的脂质体膜表面的脱落量分别是直接以醚键相 连的 PEG-CHOL 衍生物 mPEG2000-O-CHOL (图 3c) 修饰时的 4.94 和 4.74 倍。作者后续的小鼠体内实验[17] 表明, 摩尔比为 6%的 mPEG₂₀₀₀-CHEMS、mPEG₂₀₀₀-CHMC 和 mPEG₂₀₀₀-O-CHOL 修饰的胆固醇半琥珀酸 酯三羟甲基氨基甲烷盐 (CHST) 囊泡的血液循环半 衰期依次增加,分别约为 (3.4±0.3)、(3.8±0.1) 和 (4.9±0.1)h。由此可知,不同连接键的 PEG-CHOL 在 膜表面的稳定性为醚键>碳酸酯键>羧酸酯键。

Carrion 等^[18]研究显示,与 DSPC/CHOL (摩尔比为2:1)或 EPC/CHOL (摩尔比为2:1)脂质体相比,氨基聚乙二醇 3400与 CHOL 以氨基甲酸酯键相连形成的衍生物即 NH₂-PEG₃₄₀₀-C-CHOL (图 4a) (摩尔比



Figure 3 Structures of mPEG₂₀₀₀-CHEMS (a), mPEG₂₀₀₀-CHMC (b) and mPEG₂₀₀₀-O-CHOL (c)

为 5%) 修饰时, 可增加膜的流动性, 使钙黄绿素泄漏量增加。而氨基聚乙二醇 3400 通过丁二胺以氨基 甲酸酯键与 CHOL 连接形成的衍生物 NH₂-PEG₃₄₀₀-*L*-C-CHOL (图 4b) 修饰时, 膜流动性降低, 钙黄绿素 泄漏量减少。与普通脂质体相比, 摩尔比为 5%的 NH₂-PEG₃₄₀₀-C-CHOL 和 NH₂-PEG₃₄₀₀-*L*-C-CHOL 修饰时 蛋白吸附量分别减少约 28%和 66%。其原因可能是 PEG 和 CHOL 之间存在的丁二胺使 PEG 与膜表面之 间的距离增大, 此时 PEG 分子在膜表面的活动空间 较大, 增加了 PEG 分子的流动性, 使其更有效的覆盖 脂质体表面, 提供一个较好的空间保护作用。此外, 丁二胺的存在还可使胆固醇甾环插入脂质体双分子 层中的位置更合适, 使 PEG 层不易脱落, 从而减少 钙黄绿素泄漏量和血浆蛋白质吸附量, 提高脂质体 稳定性。



Figure 4 Structures of NH_2 -PEG₃₄₀₀-C-CHOL (a) and NH_2 -PEG₃₄₀₀-L-C-CHOL (b)

1.3 不同连接键对聚乙二醇-脂肪酸 (PEG-FA) 修 饰效果的影响 Silvander 等^[19]研究表明, PEG₅₀₀₀ 与 硬脂酸 (stearic acid, SA) 或棕榈酸 (palmitic acid, PA) 以醚键 (图 5a) 或酯键 (图 5b) 相连形成的衍生 物 (摩尔比为 5%) 修饰时,可加快 EPC 脂质体内钙 黄绿素的泄漏,其中以酯键连接时泄漏量较大。这可 能是因为酯键稳定性较差而导致 PEG 层的脱落,脂 质体之间相互融合聚集引起药物大量泄漏。若将酯键 或醚键换成酰胺键 (图 5c),钙黄绿素泄漏量则显著 减少,一方面可能是因为酰胺键本身的稳定性较好, 另一方面可能是因为以酰胺键连接的 PEG-FA 可以 和脂质体的磷脂之间形成氢键,进一步增加 PEG 层 在膜表面的稳定性。所以不同连接键的 PEG-FA 在膜 表面的稳定性为酰胺键 > 醚键 > 酏键。

2 脂质种类与性质对 PEG-lipid 修饰效果的影响

2.1 脂质的种类对 PEG-lipid 修饰效果的影响 Xu 等^[16]发现 75% FBS 中孵育 24 h 后, 摩尔比为 6%的



Figure 5 Structures of PEG_{5000} -FA with different chemical bonds: ether (a), ester (b), and amide (c)

mPEG₂₀₀₀-O-CHOL 从 EPC/CHOL (重量比为4:1) 脂 质体膜表面的脱落量接近 2%,而 mPEG₂₀₀₀-A-DSPE 的脱落量几乎为零。Allen 等^[7]报道小鼠尾静脉注射 mPEG₁₉₀₀-O-CHOL (摩尔比为 6%) 修饰的由鞘磷脂 (SM)、磷脂酰胆碱 (PC) 和 CHOL (摩尔比为 1:1:1) 组成的脂质体, 24 h 时其血液浓度约为注射剂量的 (11.2 ± 4.0) %,而 mPEG₁₉₀₀与 DSPE 以氨基甲酸酯 键相连形成的衍生物即 mPEG₁₉₀₀-C-DSPE (图 6) 修 饰时则约为 (38.2 ± 6.9) %。Yuda 等^[20]研究表明,小 鼠尾静脉注射摩尔比为 6%的 mPEG₈₀₀-O-CHOL 的 DSPC/CHOL (摩尔比为 1:1) 脂质体 6 h 后,其在 血液中的浓度约为注射剂量的 (7.8 ± 2.7) %,而 mPEG₁₀₀₀-DSPE 修饰时则约为 (25.0 ± 4.2) %。由上 述实验结果可知, mPEG-DSPE 在膜表面的稳定性大 于 mPEG-CHOL。



Figure 6 Structure of mPEG₁₉₀₀-C-DSPE

Sadzuka 等^[21-23]实验结果表明, mPEG₂₀₀₀-O-CHOL的亲脂性大于 mPEG₂₀₀₀与二硬脂酰甘油 (DSG) 直接以醚键相连形成的衍生物即 mPEG₂₀₀₀-O-DSG (图 7)。摩尔比为 5%的 mPEG₂₀₀₀-O-DSG 在由 DSPC、 CHOL 和二硬脂酰磷脂酰甘油 (DSPG) (摩尔比为 100:100:60) 组成的脂质体膜表面的插入比例约 为 (46.4±2.1)%, 小于 mPEG₂₀₀₀-O-CHOL 的插入比 例 (73.7±7.6)%。但是实验测得前者形成的水化层 厚度 (2.52 nm) 略大于后者 (2.28 nm)。而且 37 ℃的 50% FBS 溶液中孵育 24 h 后, 前者在膜表面的稳定 性也略大于后者。作者认为虽然 mPEG₂₀₀₀-O-CHOL 的亲脂性大于 mPEG₂₀₀₀-O-DSG, 但是由于 CHOL 是 一个单链的大的三维立体结构, 只有一部分插入膜 内或部分 CHOL 仅吸附在膜表面, 因此其在膜表面 的插入比例较大但易脱落。具有两条脂肪链的 mPEG₂₀₀₀-O-DSG 可能与磷脂或胆固醇相互作用形成 一个稳定的结构, 而使其较牢固的插入磷脂双分子层 中。这也就是说 DSG 对 PEG 的锚定能力大于 CHOL。



Figure 7 Structure of mPEG₂₀₀₀-DSG

2.2 脂肪链的长度对 PEG-lipid 修饰效果的影响 Bedu-Addo 等^[24]发现当 mPEG_{1000/3000} 与二肉豆蔻酰 磷脂酰乙醇胺 (DMPE) 以琥珀酸酯键相连形成的衍 生物 mPEG-S-DMPE 的摩尔比大于 10% 时, 可引起 二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱 (DMPC) 脂质体向胶束转 变。摩尔比为 10% 的 mPEG₁₂₀₀₀-S-DMPE 可与 DMPC 脂质体发生相分离。mPEG1000/3000与二棕榈酰磷脂酰 乙醇胺 (DPPE) 以琥珀酸酯键相连形成的衍生物 mPEG1000/3000-S-DPPE修饰时,当其摩尔比大于7%时, 将导致二棕榈酰磷脂酰胆碱 (DPPC) 脂质体的磷脂 双分子层稳定性下降。而且任何浓度的 mPEG12000-S-DPPE 均会与 DPPC 脂质体发生相分离。这可能是因 为当 PEG 相对分子质量相同时, PE 的脂肪链越长, PEG-PE 的亲水亲油平衡值 (hydrophilic lipophilic balance, HLB) 越小, PEG-PE 越不容易从膜表面脱落, PEG 链之间的相互作用越强, 其引起相分离和使脂 质体发生向胶束转变所需的临界浓度越小。

Piperoudi 等^[25]报道摩尔比为 8%的 mPEG₂₀₀₀-DSPE 在 DSPC/CHOL (摩尔比为 2:1) 脂质体膜表 面的稳定性大于 mPEG₂₀₀₀-DPPE。Li 等^[26]实验结果显 示,摩尔比为 5%的 mPEG₂₀₀₀-DSPE、mPEG₂₀₀₀-DPPE、 mPEG₂₀₀₀-DMPE 在 DSPC/CHOL (摩尔比为 55:45) 脂质体膜表面的稳定性依次减小。Maruyama 等^[27]研 究表明,小鼠尾静脉注射 mPEG₂₀₀₀-S-DSPE 修饰的 DSPC/CHOL (摩尔比为 1:1) 脂质体或 6% mPEG₂₀₀₀-S-DPPE 修饰的 DPPC/CHOL (1:1) 脂质体 24 h 后, 两者的血液浓度分别约为注射剂量的 22.0% 和 15.1% (摩尔比均为 6%)。Silvander 等^[19]发现 mPEG₅₀₀₀ 与 SA 以酰胺键相连形成的衍生物 mPEG₅₀₀₀-A-SA 修饰 的 EPC 脂质体的钙黄绿素泄漏量小于 mPEG₅₀₀₀与 PA 以酰胺键相连形成的衍生物 mPEG₅₀₀₀-A-PA 修饰时 (摩尔比均为 5%)。

Ambegia 等^[28]研究表明,小鼠尾静脉注射 mPEG₂₀₀₀与DSG以琥珀酸酯键相连形成的衍生物即 mPEG₂₀₀₀-S-DSG (图 8a)或脂质部分为二棕榈酰甘 油 (DPG)的 PEG 衍生物 mPEG₂₀₀₀-S-DPG (图 8b) 修饰的由二油酰二甲胺盐酸盐 (DODAC)和 DOPE 组成的脂质体的血液循环半衰期分别约为 15和 7 h。 mPEG₂₀₀₀ 与碳数更少的二肉豆蔻酰甘油 (DMG)以 琥珀酸酯键相连形成的衍生物即 mPEG₂₀₀₀-S-DMG (图 8c)修饰时,脂质体在小鼠体内被快速清除,血 液循环半衰期仅有 1 h 左右 (摩尔比均为 10%)。而且 后者修饰的脂质体之间易发生融合聚集,肝脾分布 量较多,肿瘤靶向效率较低。



Figure 8 Structures of mPEG₂₀₀₀-S-DSG (**a**), mPEG₂₀₀₀-S-DPG (**b**) and mPEG₂₀₀₀-S-DMG (**c**)

然而 Judge 等^[29]研究发现小鼠尾静脉重复注射 上述 PEG-lipid 衍生物修饰的脂质体会发生不同程 度的 ABC 现象。首次注射 mPEG₂₀₀₀-S-DSG 修饰的 DODAC/DOPE 脂质体 1 h 后,脂质体血液浓度约为 注射剂量的 80%,肝脏聚集量不到注射剂量的 10%。 但是 7 d 后二次注射 1 h 后脂质体血液浓度仅为 25%、 肝脏聚集量增加至 40%,肿瘤靶向效率降低了 85%。 而 mPEG₂₀₀₀-S-DMG 修饰时,二次注射 1 h 后脂质体 血液浓度约为其首次注射 1 h 后的 70%,且两次注射 时肿瘤靶向效率无明显差别。结果显示,二次注射 的 mPEG₂₀₀₀-S-DMG 修饰脂质体的肿瘤靶向效率是 mPEG₂₀₀₀-S-DSG 修饰时的 2 倍。此外,作者指出首 次注射含有 mPEG₂₀₀₀-S-DSG 的脂质体,7 d 后小鼠体 内产生的抗-聚乙二醇免疫球蛋白 (抗-PEG IgM) 约 为 mPEG₂₀₀₀-S-DMG 修饰时的 10 倍。

因此 PEG-lipid 衍生物的脂肪链越长, 脂质部分 对 PEG 分子的锚定能力越强, 其在脂质体膜表面的 稳定性越大, 修饰效果越好。但是需要考虑的是, 其 首次注射时产生的抗-PEG IgM 越多, 导致二次注射 时的 ABC 现象越强。

2.3 脂肪链的饱和度对 PEG-lipid 修饰效果的影响 有文献^[24]报道,当摩尔比大于 3%的 mPEG₅₀₀₀-S-DSPE 修饰 DSPC 脂质体时引起两相分离,摩尔比大 于 5%时可引起脂质体向胶束的转变。但是 mPEG₅₀₀₀ 与 DOPE 以琥珀酸酯键相连形成的衍生物 mPEG₅₀₀₀-S-DOPE (图 9) 修饰时,当其摩尔比≥30%时才会引 起与 DSPC 脂质体明显的相分离或脂质体向胶束转 变的现象。Li等^[26]的实验结果同样表明摩尔比为 5% 的 mPEG₂₀₀₀-DSPE在DSPC/CHOL (摩尔比为 55:45) 脂质体膜表面的稳定性大于 mPEG₂₀₀₀-DOPE。这可 能是因为 DOPE 存在不饱和键,使相邻酰基链的相 互作用力减少,降低了磷酯分子之间的排列有序性, 膜流动性增加,导致 PEG 层易脱落^[24]。



Figure 9 Structure of mPEG₅₀₀₀-S-DOPE

Parr 等^[12]报道小鼠尾静脉注射 DSPC/CHOL (摩尔比为 55:45) 脂质体的血液清除速度较快,而mPEG₂₀₀₀与 POPE 以琥珀酸酯键相连形成的衍生物即mPEG₂₀₀₀-S-POPE (图 10,摩尔比为 5%) 修饰后脂质体的血液循环半衰期稍有增加。而 mPEG₂₀₀₀-S-DSPE 修饰时,脂质体的血液循环时间则显著延长,24 h血液中约有 20%的脂质体。说明 DSPE 对 PEG 的锚定能力大于 POPE。



Figure 10 Structure of mPEG₂₀₀₀-S-POPE

当 PEG 相对分子质量和脂肪链链长相同时,

PEG-lipid 衍生物的脂肪链饱和度越大, 脂质部分对 PEG 分子的锚定能力越强, 其在膜表面的稳定性越 好, 其修饰脂质体的体内外性质越稳定。

3 PEG 端基对 PEG-lipid 修饰效果的影响

Maruyama 等^[30]实验结果显示、羧基聚乙二醇 2000 与 DSPE 以琥珀酸酯键相连形成的衍生物即 HOOC-PEG2000-S-DSPE 或 mPEG2000-S-DSPE 修饰时 (摩尔比 均为6%), EPC/CHOL (摩尔比为2:1) 脂质体的血液 循环时间及肝脾聚集量均无显著性差异。Yuda 等^[20] 研究表明、摩尔比为 6%的 HOOC-PEG2000-S-DSPE 修饰时可显著延长 DSPC/CHOL (摩尔比为 1:1) 脂 质体的血液循环时间及降低肝脾聚集量。但是亦有 文献[31]报道高反应活性的羟基基团易激活体内的 补体系统。Zalipsky 等^[32]发现小鼠尾静脉注射摩尔 比为 5% 的氨基聚乙二醇 2000-二硬脂酰磷脂酰乙醇 胺 (NH₂-PEG₂₀₀₀-DSPE) 或 mPEG₂₀₀₀-DSPE 修饰的 EPC/CHOL (摩尔比为 2:1) 脂质体 24 h 后, 脂质体 的血液浓度分别约为注射剂量的 (28.0 ± 1.8)% 和 (32.3 ± 0.4)%。这可能是因为氨基较容易靶向 C4 和 C3 补体蛋白^[33], 激活补体系统, 使脂质体血液清除 速度较快。两者修饰的脂质体在小鼠体内的组织分 布无显著性差异,所以在制备常规长循环脂质体时, 一般选择 PEG 末端为化学惰性的甲氧基的脂质衍生 物进行修饰。

4 PEG 相对分子质量对 PEG-lipid 修饰效果的影响

Yuda 等^[20]报道, PEG 相对分子质量分别为 800、 1 700、2 600 和 4 800 的 mPEG-O-CHOL (摩尔比为 6%) 修饰的 DSPC/CHOL (摩尔比为 1:1) 脂质体与 小鼠巨噬细胞 (J774 细胞) 37 ℃孵育 4 h 后, J774 细 胞对脂质体的摄取量随 PEG 相对分子质量的增大而 降低。小鼠尾静脉注射上述脂质体 6 h 后,其在血液 中的浓度随着 PEG 相对分子质量的增加而增大。

Bedu-Addo 等^[24]实验数据显示,当 mPEG₅₀₀₀-S-DPPE 的摩尔比小于 7%时, mPEG₅₀₀₀-S-DPPE 可以 插入磷脂双分子层中而不影响 DPPC 脂质体膜的稳 定性。增加 mPEG₅₀₀₀-S-DPPE 的摩尔比,将引起其与 DPPC 脂质体发生相分离。当摩尔比增大到 11%时, mPEG₅₀₀₀-S-DPPE与DPPC 脂质体发生相分离的同时 部分脂质体转变成胶束。研究还发现任何浓度的 mPEG₁₂₀₀₀-S-DPPE 均可与脂质体发生相分离。其原 因可能是长链的 PEG 分子可有效脱去磷脂双分子层 中的水分,使磷脂分子之间排列得更加紧密即容纳 脂肪链的空间变小。而且每增加一个 CH₂ 片段,高分 子聚合物的范德华内聚力就会增加 6~7.5 kJ·mol⁻¹, 这样即使在较低浓度下亦可使 PEG 链间的相互作用 力增大,导致链内和链间氢键的形成,引起 PEG 链 相互缠绕,从而使 PEG-lipid 衍生物与磷脂双分子层 发生相分离或破坏磷脂双分子层的稳定性使脂质体 向胶束转变。

Allen 等^[34]报道小鼠尾静脉分别注射摩尔比为 2%或5%的PEG相对分子质量依次为350、550和750 的mPEG-DSPE修饰的DSPC脂质体,24h三者的血 液浓度几乎一致,分别约为注射剂量的10%和17%; 而mPEG₂₀₀₀-DSPE修饰的脂质体,24h的血液浓度则 分别约为25%和31%。因此与mPEG_{350/550/750}-DSPE 相比,mPEG₂₀₀₀-DSPE修饰可显著延长脂质体的血液 循环时间。该实验结果符合Owens等^[35]的推论,当 PEG的相对分子质量较低时,PEG链的柔韧性会降低 或消失(PEG分子的高柔顺性是延长其修饰脂质体 血液循环时间的关键^[9]),此时PEG层无显著的空间 位阻效应,不能有效阻止调理素与脂质体的相互作 用,故其修饰脂质体的血液清除速度较快。

Allen 等^[7]研究发现, mPEG₅₀₀₀-C-DSPE 插入 DSPC/CHOL (摩尔比为 1:1) 脂质体膜内的比例较 小且较易脱落,这可能是因为 PEG 的相对分子质量 越大, 其亲水性越强, HLB 越大。另有文献^[24]报道、当 用摩尔比为 5%的 mPEG5000-S-DSPE 修饰 DSPC 脂质 体时,两者会发生相分离现象,继续增大 mPEG₅₀₀₀-S-DSPE 的浓度将引起脂质体向胶束的转变。Maruyama 等^[27]研究表明, 分别向小鼠尾静脉注射 PEG 相对分 子质量依次为 1 000、2 000、5 000 和 12 000 的 mPEG-S-DSPE (摩尔比为 6%) 修饰的 DSPC/CHOL (摩尔比为1:1) 脂质体3h后, 脂质体的血液浓度与 MPS 摄取量的比值依次约为 4.5、5.0、2.0 和 1.8。而 且 Allen 等^[7]的实验结果也显示, 小鼠尾静脉注射摩 尔比为6%的mPEG5000-C-DSPE修饰的SM/PC/CHOL (摩尔比为 1:1:1) 脂质体的血液清除速度略大于 mPEG1900-C-DSPE修饰的脂质体。

总之,当 PEG 的相对分子质量较低 ($M_r \leq 750$) 或较高 ($M_r \geq 5000$)时,mPEG-DSPE 修饰脂质体的体内外稳定性较差,所以通常选择相对分子质量为 2000的 PEG-lipid 衍生物来制备长循环脂质体。

5 PEG-lipid 的摩尔比对其修饰效果的影响

Bradley 等^[36]报道 mPEG₁₀₀₀-O-CHOL 的摩尔比 ≤15%时, 其插入由 EPC、CHOL 和心磷脂 (CL)(摩 尔比为 35:45:20)组成的脂质体的比例大于 90%, 当摩尔比高达 30%时插入比例则降至 (64.9±5.2)%。 将摩尔比为 5%、10%或 15%的 mPEG₁₀₀₀-O-CHOL 修饰的 EPC/CHOL/CL 脂质体与 50% 的人血浆 37 ℃ 孵育 24 h 后, mPEG₁₀₀₀-O-CHOL 在膜表面残留量依 次约为 (85.0±4.3)%、(79.3±6.3)%和 (65.5±4.8)%。 此外, 作者的体外研究表明, mPEG₁₀₀₀-O-CHOL 的摩 尔比越大, 脂质体的血清补体结合量越低。Xu 等^[16] 考察了在 37 ℃的 75% FBS 中孵育 12 h 后, 摩尔比 为 1%、2%、4%、6%和 8%的 mPEG₂₀₀₀-CHEMS 或 mPEG₂₀₀₀-CHMC 从 CHST 囊泡表面的脱落情况。实 验结果显示 PEG 的脱落量随着 mPEG₂₀₀₀-CHEMS 或 mPEG₂₀₀₀-CHMC 浓度的增加而逐渐减少。

Bedu-Addo 等^[24]发现摩尔比为 0%~7%的 mPEG₁₀₀₀₋₃₀₀₀-S-DPPE 修饰时, DPPC 脂质体的差热扫 描量热法 (differential scanning calorimetry, DSC) 图 谱上只有一个相转变峰,这说明在此浓度范围内短 链的 mPEG-S-DPPE 和磷脂双分子层具有良好的互容 性。峰宽随着 mPEG-S-DPPE 浓度增大而增加,这可 能是因为 mPEG₁₀₀₀₋₃₀₀₀-S-DPPE 作为"杂质"存在于 磷脂双分子层,减小相转变的协同性。增加 mPEG-S-DPPE 的摩尔比, DSC 图谱中在相转变峰后又出现一 个肩峰,脂质体的粒径也急剧减小,说明此时脂质体 已从多层相转变成混合胶束相。当摩尔比高达 17% 时,脂质体完全转变成胶束。电子显微镜镜检结果也 表明摩尔比为 10% 的 mPEG_{1000/3000}-S-DPPE 修饰时, 脂质体与胶束共存。

Garbuzenko 等^[37]报道加入摩尔比为 0%~8%的 mPEG2000-DSPE 对氢化大豆卵磷脂 (HSPC) 的相变 温度无明显影响, 当摩尔比增大到 12%时, HSPC 的 相变温度略有增加。当摩尔比高达25%时,类脂的这 种有序凝胶态和无序液晶态之间的相转变过程几乎 消失,这可能是因为此时脂质体已经完全转变成胶 束。此研究还表明,当 mPEG2000-DSPE 的摩尔比在 0%~4%时, mPEG2000-DSPE 浓度越大, HSPC 脂质体 粒径越小。其原因可能是 PEG 链具有较强的亲水性, 使磷脂头基周围产生强烈的水合作用, 双分子层表 面的侧向排斥力增大,阻止脂质体之间的聚集与融 合, 使脂质体的粒径减小。当摩尔比增加至 5%~7% 时, 脂质体粒径略有增大, 脂质体的热稳定性达到最 佳状态。这可能是因为此时 PEG 分子已从蘑菇状构 象 (3.5 nm) 转变成毛刷状构象 (4.5 nm)^[38], PEG 层 几乎可完全覆盖膜表面, 使其空间保护作用增强, 修 饰效果较好。当 mPEG2000-DSPE 的摩尔比大于 8%时, 脂质体粒径急剧减小、脂质体开始向胶束转变。

Bradley 等^[36]体外研究显示, 摩尔比为 5%~7% 的 mPEG₂₀₀₀-DSPE 可有效阻止 EPC/CHOL/CL 脂质

体 (摩尔比为 35:45:20) 的补体激活作用。Allen 等^[7]报道摩尔比为 5%~7%的 mPEG₁₉₀₀-C-DSPE 修饰 可显著降低 MPS 对 SM/PC/CHOL (摩尔比为 1:1: 1) 脂质体的摄取。Dos Santos 等^[39]认为摩尔比为 2%~5%的mPEG2000-DSPE可完全阻止DSPC脂质体 之间相互聚集与融合,同时作者指出 mPEG2000-DSPE 的摩尔比为 0%~5% 时, DSPC 脂质体在小鼠体 内的血液循环时间与 mPEG2000-DSPE 的浓度呈正比。 Maruyama 等^[27]考察了小鼠尾静脉注射 3 h,不同摩 尔比的 mPEG-S-DSPE (PEG 相对分子质量分别为 1000、2000、5000 和 12000) 修饰时, DSPC/CHOL (摩尔比为1:1) 脂质体的血液清除情况。结果表明, 当 mPEG-S-DSPE 的摩尔比为 0%~2%时, 脂质体血 液浓度随 mPEG-S-DSPE 浓度的增大而提高; 当摩尔 比在 2%~4%时, 血液中脂质体的浓度略有增加, 之 后达到平台期或略有下降。

一般来说,当 PEG 分子的构象介于蘑菇状与毛刷状的过渡状态时, PEG 分子既有较高的柔顺性又可形成较致密的构象云而有效地覆盖在膜表面,使 其修饰的脂质体在体内外稳定性良好^[35]。因此在 PEG化脂质体研发中,普遍使用摩尔比为5%~7%的 PEG-lipid 衍生物来修饰脂质体。

6 总结与展望

PEG-lipid 衍生物在修饰微粒靶向传递系统上 有着不可替代的优势,深入研究其对制剂的物理、 化学和生物学稳定性的影响有着十分重要的意义。 本综述从多方面阐述了不同 PEG-lipid 衍生物修饰 对脂质体体内外性质的影响,以期为寻找到保证 PEG-lipid 衍生物修饰效果的同时减弱或消除重复 注射 PEG 化脂质体引起的 ABC 现象的方法提供帮 助,同时为科研工作者进行新型辅料的合成或研 发更具有临床应用前景的靶向制剂提供一定的理 论基础。

References

- Klausner RD, Blumenthal R, Innerarity T, et al. The interaction of apolipoprotein A-I with small unilamellar vesicles of *L*alpha-dipalmitoylphosphatidylcholine [J]. J Biol Chem, 1985, 260: 13719–13727.
- [2] Muller-Eberhard HJ. The membrane attack complex of complement [J]. Annu Rev Immunol, 1986, 4: 503–528.
- [3] Allen TM, Chonn A. Large unilamellar liposomes with low uptake into the reticulo endothelial system [J]. FEBS Lett,

1987, 223: 42-46.

- [4] Gabizon A, Papahadjopoulos D. Liposome formulations with prolonged circulation time in blood and enhanced uptake by tumors [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1988, 85: 6949–6953.
- [5] Blume G, Cevc G. Liposomes for the sustained drug release *in vivo* [J]. Biochim Biophys Acta, 1990, 1029: 91–97.
- [6] Klibanov AL, Maruyama K, Torchilin VP, et al. Amphipathic polyethyleneglycol effectively prolong the circulation time of liposomes [J]. FEBS Lett, 1990, 268: 235–237.
- [7] Allen TM, Hansen C, Martin F, et al. Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives *in vivo* [J]. Biochim Biophys Acta, 1991, 1066: 29–36.
- [8] Woodle MC. Surface-modified liposomes: assessment and characterization for increased stability and prolonged blood circulation [J]. Chem Phys Lipids,1993, 64: 249–262.
- [9] Torchilin VP, Omelyanenko VG, Papisov MI, et al. Poly (ethylene glycol) on the liposome surface: on the mechanism of polymer-coated liposome longevity [J]. Biochim Biophys Acta, 1994, 1195: 11–20.
- [10] Unezaki S, Maruyama K, Ishida O, et al. Enhanced tumor targeting and improved antitumor activity of doxorubicin by long-circulating liposomes containing amphipathic poly(ethylene glycol) [J]. Int J Pharm, 1995, 126: 41–48.
- [11] Xu H, Wang KQ, Huang WW, et al. Recent advances in the study of accelerated blood clearance phenomenon of PEGylated liposomes [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2010, 45: 677-683.
- [12] Parr MJ, Ansell SM, Choi LS, et al. Factors influencing the retention and chemical stability of poly(ethylene glycol)-lipid conjugates incorporated into large unilamellar vesicles [J]. Biochim Biophys Acta, 1994, 1195: 21–30.
- [13] Kirpotin D, Hong K, Mullah N, et al. Liposomes with detachable polymer coating: destabilization and fusion of dioleoylphosphatidylethanolamine vesicles triggered by cleavage of surface-grafted poly(ethylene glycol) [J]. FEBS Lett, 1996, 388: 115–118.
- [14] Ishida T, Kirchmeier MJ, Moase EH, et al. Targeted delivery and triggered release of liposomal doxorubicin enhances cytotoxicity against human B lymphoma cells [J]. Biochim Biophys Acta, 2001, 1515: 144–158.
- [15] Xu H, Deng YH, Chen DW. Recent advances in the study of cleavable PEG-lipid derivatives modifying liposomes [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2008, 43: 18-22.
- [16] Xu H, Deng YH, Chen DW, et al. Esterase-catalyzed dePEGylation of pH-sensitive vesicles modified with cleavable

PEG-lipid derivatives [J]. J Control Release, 2008, 130: 238–245.

- [17] Xu H. Study on Vesicles/Liposomes Modified with Cleavable PEG-lipid Derivatives (可断裂 PEG 脂质衍生物修饰囊泡/ 脂质体的研究) [D]. Shenyang: Shenyang Pharmaceutical University, 2008: 101-102.
- [18] Carrion C, Domingo JC, de Madariaga MA. Preparation of long-circulating immunoliposomes using PEG-cholesterol conjugates: effect of the spacer arm between PEG and cholesterol on liposomal characteristics [J]. Chem Phys Lipids, 2001, 113: 97–110.
- [19] Silvander M, Bergstrand N, Edwards K. Linkage identity is a major factor in determining the effect of PEG-ylated surfactants on permeability of phosphatidylcholine liposomes [J]. Chem Phys Lipids, 2003, 126: 77–83.
- [20] Yuda T, Maruyama K, Iwatsuru M. Prolongation of liposome circulation time by various derivatives of polyethyleneglycols
 [J]. Biol Pharm Bull, 1996, 19:1347–1351.
- [21] Sadzuka Y, Nakade A, Hirama R, et al. Effects of mixed polyethyleneglycol modification on fixed aqueous layer thickness and antitumor activity of doxorubicin containing liposome [J]. Int J Pharm, 2002, 238: 171–180.
- [22] Sadzuka Y, Nakade A, Tsuruda T, et al. Study on the characterization of mixed polyethyleneglycol modified liposomes containing doxorubicin [J]. J Control Release, 2003, 91: 271–280.
- [23] Sadzuka Y, Sugiyama I, Tsuruda T, et al. Characterization and cytotoxicity of mixed polyethyleneglycol modified liposomes containing doxorubicin [J]. Int J Pharm, 2006, 312: 83–89.
- [24] Bedu-Addo FK, Huang L. Interaction of PEG-phospholipid conjugates with phospholipid: implications in liposomal drug delivery [J]. Adv Drug Deliv Rev, 1995, 16: 235–247.
- [25] Piperoudi S, Fatouros D, Ioannou PV, et al. Incorporation of PEG-lipids in arsonoliposomes results in formation of highly stable arsenic-containing vesicles [J]. Chem Phys Lipids, 2006, 139: 96–106.
- [26] Li WM, Xue L, Mayer LD, et al. Intermembrane transfer of polyethylene glycol-modified phosphatidylethanolamine as a means to reveal surface-associated binding ligands on liposomes [J]. Biochim Biophys Acta, 2001, 1513: 193–206.
- [27] Maruyama K, Yuda T, Okamoto A, et al. Prolonged circulation time *in vivo* of large unilamellar liposomes composed of distearoyl phosphatidylcholine and cholesterol containing amphipathic poly(ethylene glycol) [J]. Biochim Biophys Acta,

1992, 1128: 44-49.

- [28] Ambegia E, Ansell S, Cullis P, et al. Stabilized plasmid-lipid particles containing PEG-diacylglycerols exhibit extended circulation lifetimes and tumor selective gene expression [J]. Biochim Biophys Acta, 2005, 1669: 155–163.
- [29] Judge A, McClintock K, Phelps JR, et al. Hypersensitivity and loss of disease site targeting caused by antibody responses to PEGylated liposomes [J]. Mol Ther, 2006, 13: 328–337.
- [30] Maruyama K, Takizawa T, Takahashi N, et al. Targeting efficiency of PEG-immunoliposome-conjugated antibodies at PEG terminals [J]. Adv Drug Deliv Rev, 1997, 24: 235–242.
- [31] Montdargent B, Maillet F, Paule Carreno M, et al. Regulation by sulphonate groups of complement activation induced by hydroxymethyl groups on polystyrene surfaces [J]. Biomaterials, 1993, 14: 203–208.
- [32] Zalipsky S, Brandeis E, Newman MS, et al. Long circulating, cationic liposomes containing amino-PEG-phosphatidylethanolamine [J]. FEBS Lett, 1994, 353: 71–74.
- [33] Torchilinl VP, Papisov MI. Why do polyethylene glycolcoated liposomes circulate so long? Molecular mechanism of liposome steric protection with polyethylene glycol: role of polymer chain flexibility [J]. J Liposome Res, 1994, 4: 725– 739.
- [34] Allen C, Dos Santos N, Gallagher R, et al. Controlling the physical behavior and biological performance of liposome formulations through use of surface grafted poly(ethylene glycol) [J]. Biosci Rep, 2002, 22: 225–250.
- [35] Owens DE, Peppas NA. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles [J]. Int J Pharm, 2006, 307: 93–102.
- [36] Bradley AJ, Devine DV, Ansell SM, et al. Inhibition of liposome-induced complement activation by incorporated poly(ethylene glycol)-lipids [J]. Arch Biochem Biophys, 1998, 357: 185–194.
- [37] Garbuzenko O, Barenholz Y, Priev A. Effect of grafted PEG on liposome size and on compressibility and packing of lipid bilayer [J]. Chem Phys Lipids, 2005, 135: 117–129.
- [38] Hristova K, Needham D. The influence of polymer-grafted lipids on the physical properties of lipid bilayers: a theoretical study [J]. J Colloid Interface Sci, 1994, 168: 302–314.
- [39] Dos Santos N, Allen C, Doppen AM, et al. Influence of poly(ethylene glycol) grafting density and polymer length on liposomes: relating plasma circulation lifetimes to protein binding [J]. Biochim Biophys Acta, 2007, 1768: 1367–1377.